

Untersuchung der Genexpression in *Aspergillus niger* mittels Echtzeit-PCR

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Dipl.-Biol. Anke Jungebloud
aus Gehren/Thüringen

1. Referent: Prof. Dr-Ing. Dietmar C. Hempel

2. Referent: Prof. Dr. Christiana Cordes

eingereicht am: 26.02.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.04.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Fachartikel

A. Jungebloud; K. Bohle; Y. Göcke; C. Cordes; H. Horn; D.C. Hempel, (2007) Quantification of product-specific gene expression in biopellets of *Aspergillus niger* with real-time PCR. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 653-660.

Emmler, M.; Jungebloud, A.; Göcke, Y.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D.C.(2006) Scheinbare Sekretionsverzögerung durch Produktadsorption bei *Aspergillus niger* *Chem. Ing. Tech.* 78 (3), 285-288.

Emmler, M.; Hille, A.; Jungebloud, A.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D.C. (2004) Modellierung der Produktbildung durch *Aspergillus niger*. *Chem. Ing. Tech.* 76 (9), 1259-1260.

Emmler, M.; Göcke, Y.; Jungebloud, A.; Cordes, C.; Hempel, D.C.; Horn, H. (2006) Apparent delay of secretion of product secretion by *Aspergillus niger*. *Engineering in Life Sciences*. 6 (5), 488-491.

Posterpräsentationen

Yvonne Göcke; Anke Jungebloud; Kathrin Bohle; Christiana Cordes; Harald Horn; Dietmar C. Hempel. (2006) Normalization of specific mRNA quantification data in *Aspergillus niger*. 8TH European Conference on Fungal Genetics, Book of Abstracts, 2006.

Kathrin Bohle; Anke Jungebloud; Yvonne Göcke; Christiana Cordes; Harald Horn; Dietmar C. Hempel. (2006) Analysing gene expression in submerged cultivations of *Aspergillus niger*. 8TH European Conference on Fungal Genetics, Book of Abstracts, 2006.

Vorträge

Emmler, M.; Jungebloud, A.; Göcke, Y.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D.C. (2005) Scheinbare Sekretionsverzögerung durch Produktadsorption bei *Aspergillus niger* GVC – Fachausschusstagung „Systemtechnologie für industrielle Prozesse“, Braunschweig.

Emmler, M.; Jungebloud, A.; Göcke, Y.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D. C. (2004) Quantitative Produktanalyse an Biopellets von *Aspergillus niger*. GVC/Dechema Vortrags- und Diskussionstagung Simultane und integrierte Bioprozessentwicklung, Eisenach, 17.-19.

Jungebloud, A.; Emmler, M.; Göcke, Y.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D. C. (2004) Quantifizierung des Produktweges bei der Proteinerzeugung in Biopellets von *Aspergillus niger*. Bioperspectives mit 22. Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 4.-6.

Emmler, M.; Göcke, Y.; Hille, A.; Jungebloud, A.; Cordes, C.; Horn, H.; Hempel, D.C. (2003) Experimentelle Untersuchung und Modellierung intra- und interpartikularer Transport- und Reaktionsvorgänge in Biopellets von *Aspergillus niger*. Berichtskolloquium Sonderforschungsbereich 578, 23-24. Braunschweig.

Danke!

Herrn Dr.-Ing. D. C. Hempel danke ich sehr für die spannende Themenstellung, die Förderung dieser Arbeit sowie die Übernahme des Referates.

Für die fachliche Betreuung und die Übernahme des Referates danke ich herzlich Frau Prof. Dr. C. Cordes.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Horn möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen interessanten Gespräche bedanken.

Mit Ihren Diplomarbeiten haben Kathrin Bohle und Marian Haesner einen wesentlichen Beitrag zu den experimentellen Untersuchungen geleistet, wofür ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Yvonne Göcke möchte ich ganz besonders für die wertvollen Ratschläge und die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Andrea Hille und Markus Emmmler danke ich für die schöne Zeit und die wertvollen Gespräche.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 578 „Vom Gen zum Produkt“.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich stets ermutigt und vielseitig unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
2 Theorie.....	3
2.1 <i>Aspergillus niger</i>	3
2.1.1 Taxonomie.....	3
2.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung.....	3
2.2 Genexpression und Regulation in Eukaryonten.....	4
2.2.1 Genexpression.....	4
2.2.2 Genregulation.....	7
2.2.3 Genexpression und -regulation der Glucoamylasesynthese.....	9
2.2.4 Methoden zur Analyse der Genexpression.....	13
2.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Echtzeit-PCR).....	14
2.3.1 Funktionsweise.....	14
2.3.2 Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR.....	21
2.4 Normalisierung von Genexpressionsdaten.....	25
2.5 Bestimmung von Referenzgenen.....	28
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Verwendeter Stamm <i>A. niger</i> AB1.13.....	31
3.2 Modellprotein und -transkript.....	31
3.3 Kultivierungsbedingungen.....	32
3.4 Kultivierungsbegleitende Analytik.....	34
3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	34
3.4.2 Bestimmung der Glucoamylaseaktivität.....	34
3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Kohlenstoffquellen.....	35
3.5 Probenvorbereitung.....	36
3.5.1 Probennahme.....	36
3.5.2 Zellaufschluss.....	37
3.5.3 DNA-Aufreinigung.....	37
3.5.4 RNA-Aufreinigung.....	38
3.5.5 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	38
3.6 Sequenzsuche.....	40

3.7	Primerdesign	42
3.8	Echtzeit-PCR.....	45
3.8.1	Protokoll der qualitativen PCR.....	45
3.8.2	Herstellung der Standards für die Kalibrierung.....	46
3.8.3	Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR.....	48
3.8.4	Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten.....	49
3.8.5	mRNA-Quantifizierung durch Echtzeit-PCR	52
3.9	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	53
3.10	Schmelzpunktanalyse	53
3.11	Agarosegel-Elektrophorese	54
3.12	Datenverarbeitung zur Auswahl von Referenzgenen	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Genexpressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR.....	57
4.1.1	Probenaufbereitung.....	58
4.1.2	Reverse Transkription (RT).....	64
4.1.3	Echtzeit-PCR	64
4.1.4	Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten.....	66
4.1.5	Reproduzierbarkeit der Genexpressionsanalyse	68
4.2	Bezugssysteme zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten.....	71
4.3	GlaA-Genexpression bei verschiedenen Kultivierungsstrategien	89
4.3.1	Batch-Kultivierung mit Xylose und ohne Induktion.....	90
4.3.2	Batch-Kultivierung mit Xylose und Induktion durch Maltosepuls.....	91
4.3.3	Fedbatch-Kultivierung mit Induktion durch Glucose zu Kultivierungsbeginn	94
4.3.4	Vergleich der Kultivierungen hinsichtlich der <i>glaA</i> - Transkriptmenge.....	96
4.3.5	Untersuchung zur Rückkopplungshemmung der Glucoamylasessynthese	98
5	Zusammenfassung	103
6	Anhang	107
6.1	Verwendete Geräte, Kits und Chemikalien	107
6.2	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	110
6.3	Formeln und Deffinitionen.....	112
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	113
7	Literaturverzeichnis.....	116

1 Einleitung

Der filamentöse Pilz *Aspergillus niger* ist nicht nur als Saprophyt im Naturkreislauf ökologisch bedeutsam, sondern wird auch seit vielen Jahren zur industriellen Produktion von Citronensäure und Proteinen eingesetzt. *A. niger* ist dabei nicht nur für die Produktion von homologen Proteinen interessant, sondern gewinnt zunehmend für die biotechnologische Herstellung von heterologen Proteinen an Bedeutung. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die Fähigkeit dieses Pilzes, Proteine mit einer sehr hohen Effizienz zu sekretieren. Dies ist auch ein Grund, weshalb gerade das in *A. niger* effiziente Glucoamylase-expressionssystem zur Herstellung von heterologen Proteinen von großem Interesse ist. Dieses Expressionssystem hat außerdem den Vorteil, dass es durch einen starken und induzierbaren Promotor kontrolliert wird.

Die Ausbeuten solcher biotechnologischen Produktionsprozesse können allerdings sehr gering ausfallen, was die Entwicklung von Verfahren zur Optimierung der Produktivität erfordert. In der industriellen Biotechnologie wird zur Herstellung von verschiedenen Stoffen mit diesem Pilz oft nur das Endergebnis, d.h. die gewonnene Menge an Produkt für die Optimierung der Produktausbeuten herangezogen. Neue molekularbiologische Analysemethoden ermöglichen zusätzlich die Betrachtung verfahrensrelevanter Prozesse auf molekularer Ebene. Hier besteht die Möglichkeit, die Bildung des biotechnologisch interessanten Produktes im Mikroorganismus selbst bereits auf genetischer Ebene zu betrachten und auftretende Limitierungen in der Zelle auf Ebene der Transkription über die Menge an spezifischer mRNA aufzuklären.

Um nun solche transkriptionellen Veränderungen zu untersuchen, werden sehr sensitive und leistungsstarke Methoden benötigt. Eine solche Methode stellt die

Echtzeit-PCR dar, welche seit einigen Jahren in vielen Bereichen, wie der medizinischen Diagnostik, routinemäßig angewandt wird und nun auch hier für Genexpressionsstudien in *A. niger* eingesetzt werden soll. Dabei ist besonders das für die Industrie interessante Glucoamylaseexpressionssystem unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen des Pilzes zu untersuchen, um noch unbekannte Regulationsmechanismen aufzudecken und eventuelle Limitierungen auf dem Weg von der mRNA bis hin zur Bildung des Proteins festzustellen und den Kultivierungsprozess mit dem Ziel einer höheren Ausbeute anzupassen. Im Falle des Expressionssystems der Glucoamylase wurde bereits vor Jahren festgestellt, dass die Menge an *glaA*-mRNA mit der Menge an gebildeter Glucoamylase korreliert. Aufgrund dessen kann hier zusätzlich durch die Menge an mRNA eine Aussage über die zu erwartende Menge an Protein getroffen und bereits an dieser Stelle der Genexpression mit Optimierungsstrategien angesetzt werden.

Um eine exakte Quantifizierung der sehr empfindlichen mRNA-Moleküle zu gewährleisten, müssen die Arbeitsschritte von der Probennahme über den Zellaufschluss und die RNA-Aufreinigung bis hin zur Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR hinsichtlich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messung optimiert werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um spezifische mRNA von *A. niger* mittels Echtzeit-PCR zu quantifizieren. Da die korrekte Quantifizierung von mRNA durch viele Parameter, wie Verluste von RNA während der Aufreinigung sowie Effizienzunterschiede bei der für die PCR erforderliche cDNA-Synthese und Echtzeit-PCR selbst beeinflusst wird, wurde nach einem Bezugssystem gesucht, welches die gleichen Arbeitsschritte durchläuft wie die zu quantifizierende mRNA. Hierfür wurde die Gesamt-RNA als Bezugssystem eingesetzt und deren Brauchbarkeit untersucht. Ein weiteres Bezugssystem stellen Gene dar, die sich durch einen stabilen Expressionslevel auszeichnen. Hier wurden zehn Gene aus der Fraktion der Housekeeping-Gene von *A. niger* mittels Echtzeit-PCR analysiert und ihre Eignung nach Vandesompele et al. [1] bestimmt.

2 Theorie

2.1 *Aspergillus niger*

2.1.1 Taxonomie

Aspergillus niger ist ein Schimmelpilz der Gattung *Aspergillus*. Dieser Eukaryont gehört zu den höheren Pilzen (Eumyceten) und zur Gruppe der Deuteromycetes. Der Vegetationskörper gliedert sich in einzelne Hyphen, die sich vielfach verzweigen. Diese Hyphen bestehen aus dem Cytoplasma sowie dessen Einschlüssen und sind von einer festen Zellwand umschlossen. Ihre Zellwand setzt sich unter anderem aus Polysacchariden, Chitin und Chitin-Glucan-Komplexen zusammen, was der Zelle eine hohe Stabilität gegenüber mechanischer Beanspruchung verleiht [2]. Die Gesamtheit dieser Pilzhypen wird als Myzel bezeichnet. Die Vermehrung von *A. niger* erfolgt asexuell durch Sporenbildung, dabei werden an den Enden der Hyphen so genannte Konidiosporen abgeschnürt, die auskeimen und ein Myzel bilden können [3].

2.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Filamentöse Pilze haben in der Biotechnologie eine große wirtschaftliche Bedeutung, unter anderem bei der Herstellung von Antibiotika, Enzymen, organischen Säuren und Polysacchariden [4]. *Aspergillus niger* ist bekannt als der wichtigste Citronensäureproduzent und wird bereits seit 1919 zur Produktion dieser organischen Säure eingesetzt. Dabei stellt die Citronensäure das am häufigsten verwendete Säuerungsmittel in der Lebensmittelindustrie dar, was ihre

und damit die wirtschaftliche Bedeutung von *A. niger* deutlich macht. Extrazelluläre Enzyme, wie beispielsweise Pektin spaltende Enzyme, Proteasen und Glucoamylase, werden ebenfalls von *A. niger* effizient synthetisiert. Die Glucoamylase spielt dabei vorwiegend in der Stärke verarbeitenden Industrie eine große Rolle. *A. niger* ist als gesundheitlich unbedenklich eingestuft, dieser Pilz besitzt den so genannten GRAS-Status (engl., **g**enerally **r**egarded **a**s **s**afe) und ist somit als Produzent für pharmazeutische Produkte und Lebensmittelzusätze geeignet.

Für eine Verbesserung der Produktivität dieser Pilzstämmen werden neben den klassischen Methoden vermehrt gentechnische Methoden eingesetzt, um so genannte rekombinante Stämme zu erhalten. Diese modifizierten Stämme sind in der Lage, pilzeigene (homologe) native Proteine vermehrt zu produzieren. Weitere neue Techniken wie die Klonierung ermöglichen die Transformation fremder Gene in das Genom dieser Eukaryonten, was die Produktion von pilzfremden (heterologen) nativen Proteinen ermöglicht. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber prokaryontischen Expressionssystemen ist hier die Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen, welche für die Stabilität und Aktivität von Proteinen wichtig ist. Außerdem werden Proteine von diesen filamentösen Pilzen effizient sekretiert, was die Gewinnung und Aufreinigung dieser Stoffe wesentlich erleichtert.

2.2 Genexpression und Regulation in Eukaryonten

2.2.1 Genexpression

Genexpression ist die Umsetzung der in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthaltenen genetischen Information eines Gens zur Bildung eines Proteins. Die DNA-Moleküle einer Zelle bestehen aus unverzweigten Polynukleotid-Ketten und bilden einen Doppelstrang. Dabei setzt sich jeder Einzelstrang aus einer

Kombination von vier verschiedenen Nukleotiden zusammen. Diese bestehen jeweils aus einer Desoxyribose-(Zucker) Einheit, einer Phosphatgruppe am 5'C-Atom des Zuckers und einer am 1'C-Atom des Zuckers gebundenen Stickstoffbase (Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C), Thymin (T)). Dabei bilden die außen liegenden Zucker-Phosphat-Einheiten das Rückrat des DNA-Moleküls.

Die Genexpression beginnt zunächst mit der Transkription, bei welcher die Übertragung der Desoxyribonukleotidsequenz eines Gens in die mRNA-Sequenz erfolgt. Die mRNA besteht aus einem Nukleinsäurestrang und ebenfalls aus den vier Nukleotiden wie die DNA, allerdings ist hier statt der Stickstoffbase Thymin die Stickstoffbase Uracil enthalten.

Die Übersetzung der kodierenden Sequenz eines Gens in die RNA, also die Transkription, wird von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert, zu denen unter anderen die RNA-Polymerase II zählt, welche die Synthese der mRNA katalysiert. Hierfür bindet dieses Enzym zunächst in einer Region der DNA, die als Promotor bezeichnet wird und bei der Steuerung der Transkription eine wesentliche Rolle spielt (siehe Kapitel 2.2.2). Die Bindungsaffinität der RNA-Polymerase zum Promotor wird dabei in den meisten Fällen von mehreren, miteinander agierenden Transkriptionsfaktoren beeinflusst, wobei zusätzliche Faktoren diesen Vorgang fördern oder hemmen und somit die Transkription kontrollieren. Nach Bindung der RNA-Polymerase entwindet diese die DNA-Doppelhelix in einem Bereich von ca. 12 bp um den Transkriptionsstartpunkt herum und beginnt mit der Synthese eines RNA-Stranges, während sie sich am DNA-Strang entlang bewegt. Dabei werden komplementär zur jeweiligen DNA-Matrize in 5'-3'-Richtung Nukleotide an das 3'-Ende des wachsenden RNA-Moleküls angefügt. Dieser Vorgang wird als Elongation (lat., longus, „lang“) bezeichnet. Generell kann ein einzelnes Gen gleichzeitig von mehreren RNA-Polymerasen abgelesen werden, was die Anzahl der, innerhalb eines Zeitraumes gebildeten mRNA-Moleküle vergrößert und der Zelle ermöglicht, ein bestimmtes Protein in großen Mengen zu synthetisieren [5]. Die Transkriptionsrate eines bestimmten Gens hängt dabei vom Typ, der Menge und der Leistung der

beteiligten Transkriptionsfaktoren ab [6]. Dabei spielt die Kombination aus stimulierenden und inhibierenden spezifischen Faktoren eine wichtige Rolle. Der Prozess der Transkription setzt sich so lange fort, bis die RNA-Polymerase eine bestimmte Basensequenz der DNA, die Terminationsstelle, erreicht hat, welche das Signal zur Beendigung der Anlagerung von Nukleotiden an den wachsenden RNA-Strang enthält. Hier erfolgt zunächst die Freisetzung der prä-mRNA. Bevor das RNA-Molekül den Zellkern als fertige mRNA verlässt, wird sie noch weiterverarbeitet (prozessiert). Diese Prozessierung der eukaryontischen mRNA umfasst mehrere Schritte, die bereits während des Transkriptionsprozesses erfolgen. So wird beim Start der Transkription die endständige Base am 5'-Ende über eine 5'-5'-Triphosphatgruppe mit Methylguanosin verknüpft. Diese so genannte cap-Struktur schützt die mRNA vor Abbau an diesem Ende und erleichtert unter anderem den späteren Transport der mRNA in das Cytoplasma. Weiterhin besitzen die meisten prä-mRNA-Moleküle einen Poly-A-Schwanz, der aus 150–250 Adenosin-Molekülen besteht und durch eine Poly-A-Polymerase an das 3'-Ende des Moleküls angefügt wird. Diese Polyadenylierung hat ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität und die Stärke der Expression von mRNA-Molekülen.

Die meisten Gene von Eukaryonten enthalten auch nicht-kodierende Bereiche, sogenannte Introns, die zwischen kodierenden DNA-Sequenzen liegen. Diese Introns werden im Zuge der prä-mRNA-Prozessierung mit Hilfe von speziellen Kernproteinen (snRNP, engl.: **s**mall **n**uclear **r**ibonucleoproteins) entfernt. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und erfolgt bereits während der Transkription dieser mRNA-Moleküle. Danach wird die reife mRNA in das Cytoplasma transportiert, wo die Übersetzung der in der RNA-Sequenz enthaltenen Information in die Aminosäuresequenz stattfindet. Dazu wird die mRNA von zwei ribosomalen Untereinheiten gebunden, und durch Interaktion mit anderen RNA-Molekülen (tRNA, rRNA) und ribosomalen Proteinen erfolgt die Übersetzung der in der mRNA enthaltenen Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz, welche teilweise noch modifiziert und gefaltet wird, was letztlich zu einem funktionsfähigen Protein führt.

2.2.2 Genregulation

Um auf äußere Veränderungen, wie beispielsweise auf wechselnde Nahrungsangebote, reagieren zu können, müssen Organismen ihre zellulären Prozesse an die jeweiligen Bedingungen anpassen, wobei unterschiedliche biochemische Reaktionen ausgelöst werden. Die Art und Geschwindigkeit dieser zellulären Prozesse werden auf der genetischen Ebene durch die Kontrolle der Aktivität bestimmter Gene reguliert. Die Regulation der Genexpression kann prinzipiell auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden. Auf der Ebene der DNA hängt die Aktivität eines Gens beispielsweise vom organisatorischen Zustand der DNA ab. Auf RNA-Ebene wird die Aktivität eines Gens über den Zeitpunkt des Beginns und die Häufigkeit der Transkription bestimmt. Dabei wirkt sich die Regulation der Transkription am stärksten auf die Genexpression aus. Hier erfolgt die Kontrolle über die Bindung von Regulatorproteinen an bestimmte DNA-Sequenzen. Die Funktion dieser DNA-Sequenzen wurde bereits von F. Jacob und J. Monod in den 60er Jahren in prokaryontischen Zellen erforscht [7]:

1. Promotor: DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens gesteuert wird. Hier erfolgt die Bindung der RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription.
2. Operator: Regulationselement von Transkriptionseinheiten, an das Regulatorproteine (Aktivatoren und Repressoren) binden können.
3. Enhancer: DNA-Sequenz, an die aktivierende Faktoren binden und dadurch die Transkription eines Gens steigern.

Proteine, die an diese Elemente binden, können einerseits die Transkription begünstigen (Induktoren) oder unterdrücken (Repressoren).

Das Spleißen der mRNA trägt ebenfalls zur Genregulation bei. So können beispielsweise Transkripte von eukaryontischen Genen auf unterschiedliche

Weise zu verschiedenen mRNA-Molekülen gespleißt werden (alternatives Spleißen). Dadurch können aus einem Gentranskript verschiedene Proteine synthetisiert werden. Die Genexpression wird zusätzlich über den Transport der mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in das Cytoplasma reguliert. Der Transport der mRNA wird durch den Kernporenkomplex kontrolliert und ist hoch selektiv. Bei diesem Vorgang werden ausschließlich mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert, die vollständig prozessiert wurden.

Eine weitere Kontrolle der Genexpression findet auf posttranskriptioneller Ebene statt. Hierbei spielt unter anderem die mRNA-Stabilität eine wichtige Rolle. Die Lebensdauer von mRNA bestimmt die Syntheserate des zugehörigen Proteins. Die mRNA-Moleküle weisen dabei je nach Sequenz und Syntheserate des darin verschlüsselten Proteins eine unterschiedliche Halbwertszeit von wenigen Minuten bis mehr als 10 Stunden auf. So können zum Beispiel mit Adenin- und Uracil-Nukleotiden angereicherte Sequenzen im nicht-translatierten 3'-Abschnitt der mRNA-Sequenz den Abbau des Poly-A-Schwanzes, welcher das mRNA-Molekül an diesem Ende vor enzymatischem Abbau schützt, begünstigen. Weiterhin unterliegt die mRNA einem an die Translation gekoppelten selektiven Abbau. Zusätzlich ist die Länge des Poly-A-Schwanzes der mRNA wichtig für die Stabilität dieser Moleküle. Dabei wird die Länge der Poly-A-Sequenz entweder durch selektive Poly-A-Anheftung oder durch selektive Poly-A-Entfernung durch bestimmte Enzyme reguliert. Der Abbau dieser Poly-A-Nukleotide erfolgt dabei, sobald die mRNA ins Cytoplasma gelangt ist. Des Weiteren findet die Kontrolle der Genexpression bei der Übersetzung der mRNA in die Aminosäuresequenz statt. Hierbei erfolgt die Regulation über die Menge der translatierten mRNA-Moleküle und auf Proteinebene durch Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen nach ihrer Synthese [5].

Eine Ausnahme bei der Genregulation bilden solche Gene, die beispielsweise für Strukturmoleküle oder für Enzyme des Intermediärstoffwechsels kodieren. Da die Produkte dieser Gene ständig in gleich bleibender Menge der Zelle zur Verfügung

stehen müssen, werden die entsprechenden Gene weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen auf relativ konstantem Niveau transkribiert.

2.2.3 Genexpression und -regulation der Glucoamylasesynthese

Das Enzym Glucoamylase (EC 3.2.1.3) gehört zur Hauptklasse der Hydrolasen und spaltet Stärke durch Hydrolyse der α -1,4-, α -1,6- und α -1,3-Bindung am nicht reduzierten Ende des Stärkemoleküls. Höhermolekulare Verbindungen werden dabei von diesem Exoenzym eher hydrolysiert als solche mit niedrigerem Molekulargewicht [6]. Dieses Enzym wird von dem Pilz *A. niger* als homologes Protein synthetisiert und wie oben beschrieben zur Hydrolyse von Polysacchariden eingesetzt, um die dabei frei werdende Glucose für seinen Stoffwechsel verfügbar zu machen. *A. niger* bildet zwei Formen der Glucoamylase (GA): GA1 und GA2 [8]. Für GA1 wurde ein Molekulargewicht von 85,3 kDa und für GA2 von 77,6 kDa ermittelt [9]. Beide Enzyme besitzen gleiche Eigenschaften hinsichtlich ihres pH-Wert-Optimums und ihrer Temperaturstabilität [10].

Die GA2 unterscheidet sich von der GA1 durch ihre unvollständige Stärke bindende Domäne. Aufgrund dessen weist GA1 gegenüber nicht-löslicher Rohstärke eine sehr viel höhere Aktivität auf als GA2, welche keine oder nur sehr geringe Aktivität gegenüber diesem Substrat aufweist [10]. Bei der Aktivität gegenüber löslicher Stärke als Substrat gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. Hier wird einerseits von einer ähnlichen Aktivität der beiden Enzymformen gegenüber löslicher Stärke und andererseits von einer höheren Aktivität der GA1 gegenüber diesem Substrat berichtet [10]. Zu Di- und Trisacchariden weisen beide Formen fast identische Aktivitäten auf [11].

Das Gen *glaA*, welches für die Glucoamylase kodiert, wurde von Boel et al. [12] aus *A. niger* isoliert und charakterisiert sowie die Herkunft der beiden Formen dieses Enzyms erklärt. Mittels Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden,

dass die DNA des Pilzes eine Kopie des *glaA*-Gens enthält und der kodierende Sequenzbereich aus 1920 Nukleotiden besteht. Ein Vergleich der DNA und cDNA, synthetisiert aus *glaA*-mRNA, ergab, dass in der kodierenden Sequenz vier kurze (50-75 bp) und eine größere (169 bp) intervenierende Sequenz (Intron) enthalten sind, welche die kodierende Sequenz unterbrechen. Hier wurde gezeigt, dass aus einem *glaA*-Gen zwei Arten von Transkripten (mRNA) entstehen, die sich in Teilen ihrer Sequenz und der Anzahl an Basenpaaren unterscheiden. Eine Art der mRNA Transkripte enthält nach dem Spleißen noch die 169 bp lange Intronsequenz, während diese in den anderen Transkripten fehlt [13]. Daraus schlussfolgerten Boel et al. [12], [13], dass es sich in diesem Fall um zwei unterschiedliche Spleißvorgänge handeln muss und die kleinere *glaA*-mRNA, welche diese Intronsequenz nicht mehr enthält, durch alternatives (differentielles, reguliertes) Spleißen entstanden ist. Im Gegensatz dazu wird vorgeschlagen, dass die GA2 posttranslational durch die Wirkung spezifischer Proteasen aus GA1 hervorgeht [14].

Die Kontrolle der Glucoamylasesynthese erfolgt hauptsächlich auf Transkriptions-ebene durch einen starken und induzierbaren Promotor im *glaA*-Gen [15]. Die Funktionsanalyse des Glucoamylase-Promotors von *A. oryzae* ergab, dass innerhalb der Promotorsequenz zwei Regionen, welche ebenfalls bei *A. niger* analysiert wurden, für einen hohen Expressionslevel des *glaA*-Gens in Anwesenheit von Stärke (Polysaccharid) und Maltose (Disaccharid) verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass nicht Stärke, sondern die Abbauprodukte, welche aus der Stärkehydrolyse resultieren, für die Induktion dieses Promotors Ausschlag gebend sind [16]. Das Grundprinzip der Regulation der Synthese und Sekretion von Polymer abbauenden Enzymen wurde von Hodmann und Visser beschrieben [17]. Hier wird angenommen, dass eine geringe Menge dieser Enzyme konstitutiv gebildet und ins Medium sekretiert wird. In Gegenwart des jeweiligen Polymers kommt es zur Abspaltung von so genannten Signalmolekülen, welche innerhalb der Zelle als Induktoren wirken und die vermehrte Expression und Sekretion Polymer abbauender Enzyme bewirken [17]. Dieser Mechanismus konnte speziell bei der Expression des *glaA*-Gens festgestellt werden, da die Genexpression unter Kontrolle des *glaA*-

Promotors bei nicht-induzierten Bedingungen durch eine unterdrückte Transkriptionsrate charakterisiert ist, während Abbauprodukte der Stärkehydrolyse (Glucose und Maltose) induzierend auf die Glucoamylasesynthese wirken. Dies hat zur Folge, dass die Expressionsrate bei Induktion hoch und unter nicht-induzierten Bedingungen gering ist [18].

Die Regulation der Glucoamylasesynthese konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Experimente von Fowler et al. [16] und Verdoes et al. [19] führten zu der Aussage, dass die Synthese der Glucoamylase auf Transkriptionsebene limitiert ist. Fowler et al. (1990) untersuchten die Konzentration an Glucoamylase-spezifischer mRNA und stellten fest, dass diese mit der Menge an gebildetem Protein unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen korrelierte. Verdoes et al. [19] erforschten die Expression des *glaA*-Gens in rekombinanten Stämmen von *A. niger*, die mehrere Kopien dieses Gens im Genom enthielten. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigten, dass durch zusätzliche Kopien des *glaA*-Gens im Genom die Menge an synthetisiertem Protein gesteigert werden konnte. Allerdings zeigte sich ebenfalls, dass die Genexpression von dem Ort der Integration der Vektor-DNA abhängig war. Hier konnte ebenfalls festgestellt werden, dass zwischen der *glaA*-mRNA und der Menge an gebildetem Protein eine Korrelation besteht [19].

Andere Untersuchungen in diesem Zusammenhang führten Barton et al. [20] durch. Die Kultivierungen von *A. niger* wurden hier auf synthetischen Medien durchgeführt, die sich nur in der Art der Kohlenstoffquellen (C-Quellen) unterschieden. Die höchste Konzentration an Glucoamylase wurde erreicht, wenn Maltose und eine mittlere Menge an Glucose als C-Quellen im Medium vorhanden waren. Im Gegensatz dazu bildete der Pilz mit den C-Quellen Xylose oder Fructose nur geringe Mengen an Glucoamylase. Als ein starker Induktor für die Glucoamylasesynthese erwies sich Stärke [21]. Allerdings wird hier wiederum angenommen, dass nicht die Stärke, sondern die Produkte aus der Stärkehydrolyse, welche durch extrazelluläre Enzymaktivität (α -Amylase bzw. Glucoamylase) entstehen (z.B. Maltose und Glucose), die Synthese der Glucoamylase induzieren. Zu gleichen Erkenntnissen kamen Fowler et al. [16]. Hier erwies sich

ebenfalls, dass Maltose eine stark induzierende Wirkung auf den *glaA*-Promotor hatte, während Glucose eine schwächere Induktion bewirkte. Laut Fowler et al. [16], handelte es sich bei diesen Ergebnissen vermutlich um eine Kohlenstoff-Repression. Bei der Kohlenstoff-Repression, die auch als Katabolit-Repression bezeichnet wird, wird die Transkription von Genen, die für induzierbare Enzyme kodieren, durch leicht verwertbare Kohlenstoffverbindungen wie Glucose unterdrückt [6]. Mit Xylose als Kohlenstoffquelle war keine Induktion der Glucoamylase-Synthese zu beobachten. Fowler et al. [16] konnten weiterhin nachweisen, dass bei Verwendung eines Xylose-Maltose Gemisches ebenfalls eine Induktion der Glucoamylasesynthese erfolgte.

Die meisten starken Promotoren in filamentösen Pilzen, die Gene für extrazelluläre hydrolytische Enzyme kontrollieren, unterliegen einer transkriptionellen Regulation, da eine konstitutive Expression dieser Gene einen Energieverlust der Zellen zur Folge hätte [22]. Es wird angenommen, dass auch die Proteinproduktion durch den Glucoamylase-Promotor durch Kohlenstoff-Repression reguliert wird [23]. Struktur und Funktionsanalysen des *glaA*-Promotors führten ebenfalls zu dieser Vermutung [24], [23].

Für die industrielle Produktion von Glucoamylase existieren bereits optimierte Produktionsprozesse, bei denen dieses Enzym im großtechnischen Maßstab mit Produktkonzentrationen von mehr als 20 g L⁻¹ hergestellt wird [25], [26], [27].

Ein wesentlicher Grund, weshalb das Glucoamylase-Expressionssystem auch zur Herstellung von pilzfremden Proteinen eingesetzt wird, ist unter anderem die bereits erwähnte Induzierbarkeit des *glaA*-Promotors, was die Produktion von Stoffen ermöglicht, die beispielsweise für den Pilz toxisch sind [18], [28]. Weiterhin hat *A. niger* die Fähigkeit, Proteine effizient zu sekretieren, was die Aufreinigung dieser Stoffe wesentlich erleichtert. Hier wird besonders das effiziente Glucoamylase-Sekretionssystem verwendet. Dabei werden in industriellen Verfahren Proteine mit *Aspergillus*-Arten unter Verwendung von Glucoamylase-Fusionsproteinen, welche gentechnisch in das Glucoamylase-

Expressionssystem eingebracht wurden, hergestellt. Die hier verwendeten Stämme tragen häufig mehr als nur eine Kopie des transformierten Gens im Genom [18], [19]. Zusätzlich ist *Aspergillus* in der Lage, heterologe Proteine zu glykosylieren, was unter anderem für die Struktur und Stabilität von in vivo Proteinen wichtig ist [18].

2.2.4 Methoden zur Analyse der Genexpression

Um herauszufinden wie die komplexen Vorgänge der Genexpression, die beispielsweise das Wachstum von Zellen bestimmen, reguliert werden, bedarf es leistungsfähiger und sensitiver Werkzeuge, mit denen beispielsweise die Expression bestimmter Genen unter verschiedenen Einflüssen, wie Nahrungsangebot und Milieuveränderungen bei Mikroorganismen analysiert werden können.

Für die Analyse der Genexpression stehen verschiedene Methoden wie beispielsweise die Northern-Analyse, die in situ Hybridisierungstechnik, die Microarray-Analyse und die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Echtzeit-PCR, **Polymerase Chain Reaction**, PCR) zur Verfügung. Mit Hilfe der Northern-Hybridisierungs-Analyse kann eine spezifische mRNA mittels spezifischer Sonden nachgewiesen werden, wobei diese Technik noch zusätzliche Informationen über die Größe des Transkriptes und die Unversehrtheit der RNA gibt. Bei der in situ Hybridisierungstechnik kommen ebenfalls spezifische Sonden zum Einsatz. Diese Technik ermöglicht die Untersuchung der lokalen Expression spezifischer Gene direkt in einer Zelle. Für die Analyse der Genexpression wird ebenfalls die Microarray-Analyse eingesetzt. Hier können Tausende von mRNA-Spezies gleichzeitig untersucht und deren Expressionslevel miteinander verglichen werden, wodurch sich diese Technik von den bisher erläuterten wesentlich unterscheidet [29]. Die Echtzeit-PCR ermöglicht im Gegensatz zu den bisher erläuterten Methoden auch geringste Mengen an Nukleinsäuremolekülen zu vervielfältigen, anschließend zu analysieren und zu quantifizieren, was beispielsweise die Expressionsanalyse von Transkripten, die nur in sehr geringer

Menge vorkommenden ermöglicht. In der Echtzeit-PCR können mehrere Proben parallel vermessen werden, was einen wesentlichen Vorteil bei der Genexpressionsanalyse darstellt, da hier meist eine große Anzahl an Proben untersucht werden muss. Zudem handelt es sich hierbei um die derzeit sensitivste und flexibelste Methode für die Untersuchung der Genexpression, die gerade in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat [30].

2.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Echtzeit-PCR)

2.3.1 Funktionsweise

Die Methode der Echtzeit-PCR basiert auf der Polymerasekettenreaktion, welche heute eine der wichtigsten biochemischen Verfahren für die Nukleinsäure-Analytik und eine Standardmethode für die qualitative Analyse von DNA und RNA aus einer Vielzahl verschiedener Proben und Organismen dargestellt. Mittels PCR können aus einem Pool von Nukleinsäuremolekülen spezifische Sequenzabfolgen von gering konzentrierten Nukleinsäuren selektiv und schnell vervielfältigt (amplifiziert) werden, um diese für weitere Analysen zugänglich zu machen. Allerdings kann in die Polymerasekettenreaktion ausschließlich DNA eingesetzt werden, so dass zu analysierende RNA zuvor in eine sogenannte cDNA (engl.: **complementary DNA**) umgewandelt werden muss (siehe Kapitel 3.5.5). Das Grundprinzip der PCR ist in **Abbildung 2.1** dargestellt.

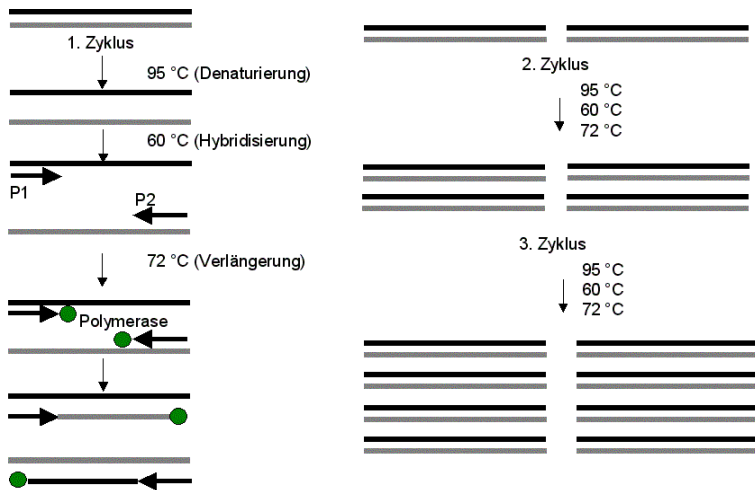


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der PCR (P1: Vorwärtsprimer, P2 Rückwärtsprimer) mit drei Temperaturzyklen (ein Zyklus: 95 °C, 60 °C, 72 °C).

Die Reaktion beginnt mit dem Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges (Denaturierung) bei einer Temperatur von 95 °C. Die zwei Einzelstränge der DNA dienen dann in den sich anschließenden Reaktionsschritten als Vorlage für die katalysierte Vervielfältigung einer ausgewählten Nukleotidsequenzabfolge. Die Spezifität der zu vervielfältigenden Nukleotidsequenz wird durch so genannte Primer festgelegt. Diese Oligodesoxyribonukleotide sind komplementär zur Zielsequenz und lagern sich nach Erniedrigung der Temperatur auf 50-60 °C an die Zielsequenz an (Hybridisierung). Dabei lagert sich der Primer (Vorwärtsprimer, P1) an einen DNA-Strang und ein weiterer (Rückwärtsprimer, P2) an den anderen komplementären DNA-Strang an. Diese Primer, jeweils aus 10-30 Desoxyribonukleotiden bestehend, sind zu den Enden der zu vervielfältigenden Sequenz komplementär und dienen nach Anlagerung an die Zielsequenz als Startpunkt für die Polymerisation. Dabei wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Diese Reaktionstemperatur ist optimal für die Katalyse der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, welche aus einem thermophilen Bakterium stammt (*Thermus aquaticus*) [31]. Diese drei aufeinander folgenden Reaktionsschritte (Denaturierung, Hybridisierung, Verlängerung) beschreiben einen Zyklus der Polymerasekettenreaktion. Eine mehrfache Wiederholung dieses

Zyklus führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der ausgewählten Sequenzabfolge. Diese exponentielle Produktbildung wird von vielen verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Qualität der Probe, Enzym-Inhibitoren, der Qualität des verwendeten Enzyms, der Konzentration der DNA sowie der Nukleotide und Primer begrenzt. Dadurch verringert sich im Laufe der Polymerasekettenreaktion die Produktbildungsrate bis diese letztlich auf Null zurückgeht und sich die Gesamtmenge an gebildeter Nukleinsäuremoleküle (PCR-Produkte) auf einen konstanten Wert einstellt (Plateauwert).

Die Effektivität und die Spezifität der PCR wird dabei von vielen Faktoren, wie der Spezifität der Primer gegenüber der Zielsequenz, der Qualität der DNA-Matritze, der Reaktionsbedingungen der PCR sowie durch die Funktionstüchtigkeit der DNA-Polymerase beeinflusst. Dabei hat die MgCl_2 -Konzentration einen großen Einfluss auf die Anlagerung der Primer an die Zielsequenz sowie auf den Einbau von Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) zur Verlängerung der Primer. Zusätzlich stimuliert dieses anorganische Molekül die Aktivität der DNA-Polymerase.

Werden in die PCR parallel zur Probe noch Standards bekannter Konzentration eingesetzt, wird diese als kompetitive PCR bezeichnet. Für die quantitative Bestimmung der Nukleinsäuremoleküle wird der PCR-Ansatz nach ca. 20 –30 Zyklen abgebrochen und die PCR-Produkte anhand der nach einer Agarosegel-Elektrophorese entstandenen Bande über deren Intensität und durch Vergleich mit der Bandenintensität von Standards quantifiziert.

Die Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der Polymerasekettenreaktion nach Mullis [31] dar. Mit Hilfe dieser Methode kann zusätzlich zur qualitativen Analyse spezifischer DNA-Abschnitte auch eine Aussage über deren Menge getroffen werden, die zu Beginn der Reaktion in der Probe vorlag. Bei diesem Verfahren, der quantitativen PCR wird die exponentielle Phase der PCR betrachtet und für die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren herangezogen. In der exponentiellen Phase der PCR ist die Reaktionseffizienz näherungsweise

konstant, was eine Quantifizierung der Probe und einen Vergleich mit anderen Proben eines PCR-Laufs ermöglicht. Um den Zeitpunkt der exponentiellen Phase der PCR bestimmen zu können, muss die Produktakkumulation verfolgt werden. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Fluoreszenzintensität sich proportional zur Produktmenge verhält. Da hier die Messung in Echtzeit erfolgt, wird dieses Verfahren als Echtzeit-PCR bezeichnet. Die Echtzeit-PCR hat in den letzten Jahren besonders für Genexpressionsstudien große Bedeutung gewonnen. Mit Hilfe dieser Messmethode ist es möglich, auch geringste Mengen an Nukleinsäuremolekülen zu bestimmen, wie es beispielsweise bei der Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren notwendig ist, da deren mRNA nur in sehr geringen Mengen in den Zellen vorhanden ist. Dabei erfolgt die Quantifizierung von Nukleinsäuremolekülen mittels Echtzeit-PCR mit einer sehr hohen Genauigkeit und Sensitivität. Weiterhin zeichnet sich diese Methode durch einen relativ großen dynamischen Bereich der quantitativen Messung sowie durch die Möglichkeit, viele Proben gleichzeitig quantifizieren zu können, aus [32].

Für die Aufnahme des Fluoreszenzsignals während der PCR sind Echtzeit-PCR-Geräte mit einer optischen Einheit ausgestattet. Für die quantitative Bestimmung kommen Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Reaktionskomponenten zum Einsatz, die während der PCR mit der DNA interagieren, was eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zur Folge hat, online verfolgt und mittels Detektor aufgezeichnet wird. Zur Anwendung kommen hier entweder unspezifische oder spezifische Signalgeber.

Unspezifische Signalgeber

Diese Signalgeber sind Substanzen, welche unspezifisch, also unabhängig von der DNA-Sequenz in den DNA-Doppelstrang interkalierten und nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren. Der heute am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist das SYBR®-Green (Emission: 522 nm). SYBR®-Green ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, welcher sequenzunspezifisch in der kleinen Furche der DNA bindet. Nach Bindung des Farbstoffes fluoresziert dieser 1000 mal stärker als frei in Lösung vorliegend.

Dies ist auch der Grund, weshalb SYBR®-Green für den Nachweis der Akkumulation der PCR-Produkte in der Echtzeit-PCR eingesetzt wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration zu [33]. Ein wesentlicher Vorteil dieses sequenzunspezifischen Signalgebers ist seine universelle Einsetzbarkeit, da jede beliebige DNA-Probe quantifiziert werden kann. Ein Nachteil hingegen ist, dass dieser Fluoreszenzfarbstoff auch an unspezifische Sequenzen binden kann und somit auch unspezifische Sequenzen detektiert werden, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führen und sich negativ auf die Genauigkeit der Quantifizierung auswirken kann [34]. Dennoch stellt SYBR®-Green eine kostengünstige Möglichkeit zur Generierung von produktabhängiger Fluoreszenz dar. Zur Kontrolle der Qualität der vervielfältigten PCR-Produkte kann die Schmelzkurvenanalyse herangezogen oder eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob ausschließlich das gewünschte PCR-Produkt gebildet wurde.

Spezifische Signalgeber

Zu diesen Signalgebern gehören Hydrolysesonden [35], [36] und fluoreszenzgekoppelte Primern. Ein wesentliches Merkmal dieser Detektionssysteme ist ihre besonders hohe Spezifität gegenüber der zu quantifizierenden DNA-Sequenz, die mittels PCR vervielfältigt wird. Die Hydrolysesonden basieren auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [34]. Die Hydrolysesonde besteht aus einem Oligonukleotid, welches mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt ist, die sich jeweils am 5'- bzw. 3'-Ende, in räumlicher Nähe zueinander befinden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden als Reporter und Quencher bezeichnet. Aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer kommt es nach Anregung einer für den Reporter spezifischen Wellenlänge zu keiner, für diesen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen messbaren Emission, wenn dieser sich in räumlicher Nähe zum Quencher befindet und das Anregungsspektrum des Quencher dem Emissionsspektrum des Reporters entspricht. Die Sonde hybridisiert in einem Bereich, der zwischen den beiden Primern liegt, an einem Strang der ausgewählten DNA-Sequenz. Aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase werden während der Polymerasekettenreaktion die Sondennukleotide abgespalten, was die Freisetzung und räumliche Trennung des Reporter und Quencher zur Folge hat. Die dadurch erfolgte räumliche Trennung dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe bewirkt die Zunahme der Fluoreszenz durch die Emission des Reporters bei einer für diesen Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Wellenlänge. Durch Messung der Lichtstärke bei dieser Wellenlänge kann so die Produktakkumulation verfolgt werden.

Ebenfalls spezifische Signalgeber sind die fluoreszenzmarkierten LUX™-Primer (Invitrogen). Das Prinzip dieser Signalgeber beruht nicht auf dem FRET-Prinzip. Hier ist einer der beiden Primer an seinem 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) gekoppelt. Das 5'-Ende ist komplementär zum 3'-Ende, so dass sich eine Haarnadelstruktur ausbildet. Diese Gestalt des Primers bewirkt eine Unterdrückung des Reportersignals (siehe **Abbildung 2.2**).

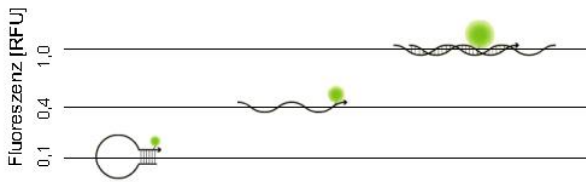


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung eines LUX™-Primers (mit Fluoreszenzfarbstoff), dessen Konformationsänderung nach Bindung an Nukleinsäuremolekül sowie die relative Fluoreszenz des an den LUX™-Primer gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes.

Kommt es im Laufe der Reaktion zur Aufhebung der Haarnadelstruktur, bewirkt diese Konformationsänderung des Primers bereits eine leichte Verstärkung des Fluoreszenzsignals, wie in Abbildung 2.2. dargestellt. Nach der Hybridisierung des Primers an die Ziel-DNA kommt es schließlich zu einer Verzehnfachung des Signals (siehe Abbildung 2.2).

Ein Vergleich der LUX™-Primertechnologie mit dem Sondensystem macht deutlich, dass letztgenannte durch die Kombination der Spezifität der Primer und der Sonde mit einer zusätzlich zur Zielsequenz komplementären Sequenzabfolge spezifischer sind als das LUX™-Primer-System. Weiterhin kann es bei Verwendung der LUX™-Primer während der Echtzeit-PCR auch zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignales kommen, wenn sich diese an andere als die gewünschten spezifischen-DNA-Abschnitte anlagern. Aufgrund dessen sollte bei Verwendung dieses Detektionssystems die Fluoreszenzdatenaufnahme bei einer höheren Temperatur erfolgen, bei welcher die spezifischen Vervielfältigungsprodukte (Amplifikate) noch als Doppelstrang vorliegen. Die Temperatur sollte ebenfalls so gewählt werden, dass keine Primerdimere solcher LUX™-Primer vorliegen, die ebenfalls nach Zusammenlagerung eine Fluoreszenzzunahme bewirken. Weiterhin wird angeraten, nach Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR eine Kontrolle bezüglich der Qualität dieser Messung durchzuführen. Eine Kontrollmöglichkeit ist zum einen die Schmelzkurvenanalyse und zum anderen eine Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 3.10). Wesentliche Vorteile der LUX™-Primer gegenüber den Sondensystemen sind allerdings die geringeren Kosten

sowie der relative geringe Aufwand beim LUX™-Primerdesign gegenüber dem Sondendesign (siehe Kapitel 3.6).

2.3.2 Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR

Die quantitative Analyse von Nukleinsäuren mit Hilfe der Echtzeit-PCR basiert auf der Kinetik der PCR-Reaktion, bei der in mehreren Zyklen eine Produktakkumulation erfolgt. In den ersten Zyklen erfolgt die Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte exponentiell. Die Fluoreszenzzunahme ist in den ersten Zyklen allerdings sehr gering, weshalb sich hier zunächst ein relativ konstantes Fluoreszenzsignal ergibt. Erst mit zunehmender Produktakkumulation steigt das Fluoreszenzsignal ebenfalls exponentiell an.

Mit steigender PCR-Zyklenzahl nehmen allerdings auch störende Einflüsse zu, so dass die Vervielfältigung der Nukleinsäuremoleküle zwar noch erfolgt, aber nicht mehr exponentiell ist. Solche störenden Einflüsse können zum einen ein Aktivitätsverlust der DNA-Polymerase oder die Zusammenlagerung von Nukleinsäuremolekülen sein, so dass aufgrund sterischer Behinderung der Vervielfältigung eine Vervielfältigung dieser Sequenzen nicht mehr möglich ist. Weiterhin kann auch ein Mangel an Reaktionskomponenten wie Oligonukleotide oder Nukleotide ein Grund für die abnehmende Reaktionseffizienz sein. An die Vervielfältigungsphase schließt sich eine stationäre Phase an, in welcher die Reaktion zum Stillstand kommt. Somit ergibt sich der für eine PCR charakteristische sigmoidale Kurvenverlauf (**Abbildung 2.3**).

Die während der PCR aufgenommenen Fluoreszenzsignale werden anschließend zur Auswertung herangezogen. Für die Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration kann zum einen der so genannte Schwellenwertzyklus (threshold cycle, Ct-Wert) verwendet werden (siehe **Abbildung 2.3**). Der Ct-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, welche notwendig sind, ein definiertes

Fluoreszenzsignal, welches auch als Fluoreszenzschwellenwert bezeichnet wird, zu überschreiten [37].

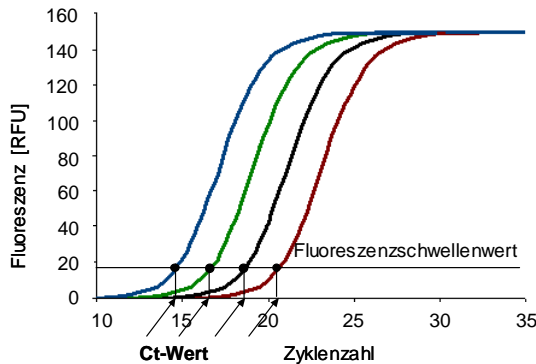


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung von Echtzeit-PCR Kurven mit dem Fluoreszenzschwellenwert und dem Ct-Wert.

Der Fluoreszenzschwellenwert wird so festgelegt, dass ihn die PCR-Kurve zu Beginn des exponentiellen Verlaufes schneidet. Dabei gilt für die Fluoreszenzsignalkurve jeder Probe eines PCR-Laufes derselbe Schwellenwert. Anschließend erfolgt jeweils die Bestimmung des zugehörigen Ct-Wertes. Je höher die DNA-Konzentration einer Probe zu Beginn der PCR war, um so eher wird die Schwellenfluoreszenz erreicht bzw. der festgelegte Fluoreszenzschwellenwert überschritten. Demzufolge ergeben sich bei Proben mit hoher DNA-Konzentration geringe Ct-Werte und höhere Ct-Werte für Proben mit weniger DNA.

Eine weitere Möglichkeit für die Bestimmung der DNA-Konzentration basiert auf der Berechnung des Maximums der zweiten Ableitung der sigmoidalen PCR-Kurve (second derivative maximum, X_{SDM} -Wert), welches den Wendepunkt der ersten Ableitung darstellt [38] (**Abbildung 2.4**). Dieser Wendepunkt beschreibt das Ende der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, d.h. den Zeitpunkt, von welchem an die oben genannten begrenzenden Faktoren einen immer stärker werdenden Einfluss auf die Reaktion haben (Kapitel 3.8.4).

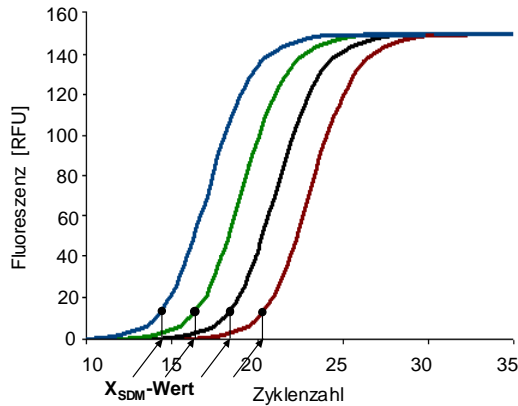


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung von Echtzeit-PCR Kurven und dem X_{SDM} -Wert.

Die Quantifizierung von produktspezifischer mRNA mittels der Echtzeit-PCR kann entweder relativ oder absolut erfolgen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Änderung des mRNA-Levels eines Gens relativ zum Expressionslevel einer internen Referenz bestimmt. Dabei wird der Expressionslevel des betrachteten Gens direkt mit dem des Referenzgens verglichen und das Verhältnis zueinander ermittelt. Dabei darf der Expressionslevel des Referenzgens nicht variieren [39].

Für eine absolute Quantifizierung werden Standards mit bekannter Konzentration in die Echtzeit-PCR eingesetzt und aus den sich daraus ergebenden Werten (Ct-Wert, X_{SDM} -Wert) eine Standardkurve erstellt. Dabei wird der Ct- oder der X_{SDM} -Wert über dem Logarithmus der cDNA-Konzentration aufgetragen, woraus sich eine Kalibriergerade ergibt. Mittels der dazugehörigen Geradengleichung erfolgt die Konzentrationsbestimmung der unbekannten Proben **Abbildung 2.5** [40].

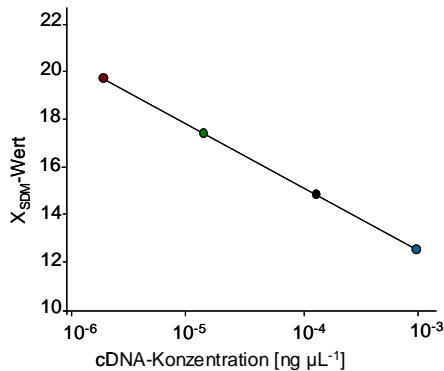


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung einer Kalibriergeraden. Aufgetragen sind die X_{SDM} -Werte welche sich aus Echtzeit-PCR Daten von cDNA unterschiedlicher Konzentration ergeben.

Als Standards für die Kalibrierung können verschiedene Nukleinsäuremoleküle eingesetzt werden. Die genomische DNA ist eines davon. Hier werden Standardlösungen hergestellt, welche genomische DNA mit unterschiedlicher Konzentration enthalten. Diese genomischen DNA-Moleküle enthalten unter anderem auch die Sequenzabfolge der zu untersuchenden Sequenz. Ist die Größe des Genoms (angegeben in Basenpaaren bp) bekannt, kann aus der DNA-Konzentration und dem Molekulargewicht bestimmt werden, wie vielfach das Genom in der Lösung vorliegt. Ist weiterhin bekannt, wie viele Kopien in der zu quantifizierenden Zielsequenz im Genom vorhanden sind, kann daraus die Kopienzahl der Zielsequenz in der Standardlösung berechnet werden [41].

Weiterhin können Plasmid-DNA-Standards zum Einsatz kommen, in welche die Zielsequenz eingebracht wurde. Auch hier wird die Anzahl der Kopien der eingebauten Zielsequenz über das Molekulargewicht der Plasmide ermittelt [38].

Eine weitere Möglichkeit zur absoluten Quantifizierung ist, aufgereinigte Nukleinsäuremoleküle als Standards zu verwenden, welche zuvor in der PCR vervielfältigt wurden und ausschließlich aus der Nukleinsäuresequenz der zu quantifizierenden DNA-Sequenz bestehen [42], [43].

2.4 Normalisierung von Genexpressionsdaten

Die Echtzeit-PCR wird unter anderem zur quantitativen Bestimmung spezifischer mRNA eingesetzt, welche wie bereits erwähnt zunächst in komplementäre cDNA umgeschrieben werden muss (siehe Kapitel 2.3). Mittels der im vorherigen Kapitel beschriebenen Standards erfolgt eine quantitative Aussage der parallel in die PCR eingesetzten Proben. Die Bestimmung der RNA-Moleküle birgt allerdings viele variierende Faktoren in sich, was die Genauigkeit der Quantifizierung erheblich beeinflussen kann. Soll beispielsweise die Menge an RNA in Zellen analysiert werden, muss die RNA nach Zellaufschluss zunächst isoliert und aufgereinigt werden. Besonders bei dieser Prozedur kann es zu Verlusten von RNA kommen, was die Quantifizierung erschwert. Hinzu kommt, dass auch die Menge des eingesetzten Biomaterials variieren kann, was bereits zu Unterschieden in der Gesamt-RNA-Menge der Proben führt. Die vor der Quantifizierung durchzuführende cDNA- Synthese kann ebenfalls das quantitative Ergebnis verfälschen, da hier Effizienzunterschiede während des Umschreibens der RNA in cDNA auftreten können, so dass möglicherweise nicht die gesamte, in den Proben enthaltene mRNA umgeschrieben wird.

Um nun diese Variationen bei der mRNA-Quantifizierung auszugleichen, bedarf es einer Normalisierung der mittels Echtzeit-PCR generierten Daten. Dafür werden einige Möglichkeiten, wie beispielsweise die Gesamt-RNA als Referenzsystem vorgeschlagen [44]. Durch die Verwendung der Gesamt-RNA als Referenz werden die Verluste an RNA, die während des Zellaufschlusses und der RNA-Aufreinigung auftreten können, korrigiert. Nachteil dieses Bezugssystems ist allerdings, dass der Einfluss der Effizienz der reversen Transkription nicht mit erfasst wird. Weiterhin kann diese Referenz nicht verwendet werden, wenn zu wenig Gesamt-RNA vorhanden ist [36]. Außerdem ist die Genauigkeit der Quantifizierung im wesentlichen von der Genauigkeit der Gesamt-RNA-Konzentrationsbestimmung abhängig. Erfolgt diese mittels eines Spektrophotometers sind die Reinheit und die Qualität der RNA-Proben zudem besonders wichtig. Hier können beispielsweise freie Nukleotide oder nach der

Aufreinigung noch enthaltene organische Substanzen die Konzentrationsbestimmung erheblich verfälschen. Die Messwerte können ebenfalls beeinflusst werden, wenn in den Gesamt-RNA-Proben DNA-Moleküle enthalten und da bei der Anwendung dieser Methode zwischen diesen beiden Molekülen nicht unterschieden werden kann, was zur Verfälschung der Messergebnisse führt. Die Instabilität der RNA macht dieses Bezugssystem zusätzlich problematisch. Weitere wesentliche Nachteile sind zum einen die Tatsache, dass der Gesamt-RNA-Gehalt von Zellen, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gewachsen sind, stark variieren kann [44].

Die rRNA, welche den Hauptbestandteil der Gesamt-RNA darstellt, wurde als ein alternatives Bezugssystem zur Gesamt-RNA vorgeschlagen [45], [46]. Allerdings ist dieses Bezugssystem auch kritisch zu betrachten, da sich die Expressionslevel der mRNA und rRNA unter anderem aufgrund der unterschiedlichen RNA-Polymerasen stark unterscheiden können [32].

Zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten können auch homologe externe RNA-Standards verwendet werden, welche mittels *in vitro*-Transkription synthetisiert und entweder zur Gesamt-RNA-Probe oder vor der RNA-Aufreinigung zur Probe hinzugefügt werden. Homologe RNA-Standards sind so konstruiert, dass sie bis auf wenige Nukleotide die gleiche Nukleotidsequenz wie die zu quantifizierende RNA besitzen, wodurch sich die in die PCR eingesetzten Primer für die Ziel-RNA und die als Referenz genutzten Standard-RNA kaum unterscheiden. Es werden auch so genannte heterologe RNA-Standards eingesetzt, deren Nukleotidsequenz sich von der Sequenz der zu quantifizierenden mRNA wesentlich unterscheiden können [47], [48]. Bei der Normalisierung sowohl mittels homologer als auch heterologer Standards werden die Verluste von RNA während der Aufreinigung sowie die Variation der reversen Transkription mit berücksichtigt. Dabei berechnet sich die relative mRNA-Expression der Proben aus dem Verhältnis der Konzentrationen der Probe zur Referenz [49]. Diese Standards sind entweder kommerziell erhältlich oder müssen vom Anwender selbst synthetisiert werden, indem die jeweilige Nukleotidsequenz

in ein Plasmid kloniert und anschließend in vitro transkribiert wird, was einige Fertigkeiten voraussetzt [48].

Genomische DNA kann ebenfalls zur Normalisierung von quantitativen Daten eingesetzt werden [50]. Vorteil hier ist, dass keine reverse Transkription notwendig ist und die DNA sofort in die Echtzeit-PCR eingesetzt werden kann. Doch ist hier zu beachten, dass proliferierende Zellen ihre DNA replizieren, demzufolge ist in diesen Zellen im Vergleich zu Zellen, die sich nicht in der Zellteilungsphase befinden, das zu quantifizierende Gen mehrfach enthalten. Ein weiterer wesentlicher Nachteil dieses Bezugssystems ist, dass die in einer Probe enthaltene RNA und DNA nicht gleichzeitig aufgereinigt werden können, wodurch bei Verwendung von DNA als Bezugssystem mögliche Verluste der RNA während der Aufreinigungsschritte nicht berücksichtigt werden. Zudem werden eventuell auftretende Effizienzunterschiede während der cDNA-Synthese mit diesem Bezugssystem nicht ausgeglichen.

Die einfachste und populärste Methode für die interne Kontrolle der bei der quantitativen Bestimmung von mRNA auftretenden Variationen ist die Normalisierung mit Referenzgenen. Vorteil dieses Bezugssystems ist, dass die mRNA solcher Gene in der Probe enthalten ist und somit jeden einzelnen Schritt der Probenaufbereitung, von der Probennahme bis hin zur Quantifizierung der Nukleinsäuren mittels Echtzeit-PCR, gemeinsam mit der zu quantifizierenden mRNA durchläuft.

Ein Gen eignet sich allerdings nur dann als Referenz, wenn es unter den Bedingungen, unter denen auch die zu quantifizierende mRNA gebildet wurde, stets eine gleichbleibende Expression aufweist. Solche Gene werden oft in der Fraktion der Housekeeping-Gene (Housekeeping-Gene) gefunden. Hierbei handelt es sich um Gene, deren synthetisierten Proteine am Erhaltungsstoffwechsel der Zelle beteiligt sind und demzufolge idealerweise eine konstante, vom Zustand der Zelle unabhängige Expression aufweisen. Oftmals werden zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten klassische Housekeeping-

Gene, wie beispielsweise β -Actin, ein Protein des Cytoskellets, oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse als Referenzgene eingesetzt [51], [52]. Doch immer häufiger wird deren Eignung dafür in Frage gestellt [53], [54], [55], [56].

Ein Literaturstudium zeigt, dass bis heute noch kein ideales Kontrollgen gefunden wurde, welches unabhängig von äußeren Einflüssen und vom jeweiligen Organismus oder Gewebe einen stabilen Expressionslevel aufweist [57]. Aufgrund dessen müssen solche Referenzgene zunächst für jeden Organismus, jedes Gewebe und für die jeweilige experimentelle Bedingung sorgfältig bestimmt werden. Vandesompele et al. [1] beschreiben einen Lösungsansatz zur Bestimmung von Referenzgenen, der eine Identifizierung von Genen mit einem konstanten Expressionslevel ermöglicht und im folgenden Kapitel beschrieben wird.

2.5 Bestimmung von Referenzgenen

Grundlage für die Bestimmung von Referenzgenen nach Vandesompele et al. [1] ist, dass das Verhältnis zweier Kontrollgene, das heißt der Quotient ihrer Expressionslevel in allen untersuchten Proben gleich ist, unabhängig von den experimentellen Bedingungen. Variiert der Quotient der untersuchten Proben, wird mindestens eines dieser Gene nicht konstant exprimiert. Ziel ist dabei, eine Kombination von idealen Genen zu finden, die eine möglichst geringe Variation der Quotienten der entsprechenden Expressionslevel aufweist. Vandesompele et al. [1] schlugen weiterhin vor, mehrere Referenzgene zur Normalisierung heranzuziehen, um eventuell auftretende, leichte Expressionsschwankungen ausgleichen zu können. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit nach mehreren Genen gesucht, die die oben genannten Anforderungen erfüllen. Aus den Expressionsdaten dieser Gene wird anschließend ein Normalisierungsfaktor berechnet.

Zur Identifizierung dieser Gene wird wie folgt vorgegangen:

Zu Beginn wird auf der Basis nicht normalisierter Expressionsdaten für jede Kombination aus zwei Kontrollgenen j und k eine Menge A_{jk} aus m Elementen ermittelt (Gleichung 2.1) und deren Standardabweichung bestimmt (Gleichung 2.2). Dabei ist m die Anzahl der Proben. Die Elemente A_{jk} stellen den Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses der Expressionsdaten beider Gene ($\log_2(a_{ij}/a_{ik})$) dar.

$$(\forall jk \in [1, n], j \neq k)$$

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left(\frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (2.1)$$

$$V_{jk} = st.dev(A_{jk}) \quad (2.2)$$

Resultieren aus dieser Gleichung geringe Werte für die Standardabweichung V_{jk} , entspricht das einer geringen Variation und somit einer hohen Expressionsstabilität dieser Gene, während hohe Werte das Gegenteil bedeuten.

Anschließend wird für jedes Gen ein so genanntes Genstabilitätsmaß bestimmt.

Das Genstabilitätsmaß M_j für das Gen j ergibt sich letztlich aus dem arithmetischen Mittel der paarweisen Variationen V_{jk} für das Gen j in Kombination mit allen anderen betrachteten Genen k .

$$(\forall jk \in [1, n], j \neq k)$$

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1} \quad (2.3)$$

Für jedes Gen wird somit ein Genstabilitätsmaß M berechnet, welches die mittlere Variation der Expressionsstabilität unter Einbeziehung aller Zweierkombinationen, an denen das Gen beteiligt ist, beschreibt. Das Gen mit dem höchsten M -Wert entspricht dabei dem Gen mit der instabilsten Expression und wird daher ausgeschlossen. Anschließend folgt eine Neuberechnung der Genstabilitätsmaße mit den noch verbleibenden Genen. Dies wird solange, wiederholt bis sich schließlich eine Kombination aus zwei Genen ergibt, welche die geringsten Werte für M und damit die stabilste Genexpression aufweisen. Danach werden die Gene aufgrund der Reihenfolge des schrittweisen Ausschlusses der einzelnen Gene durch die wiederholte Berechnung der Genstabilitätsmaße M hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität geordnet. Die Gene mit den geringsten Schwankungen in der Expressionsstabilität können zur Berechnung des Normalisierungsfaktors $NF_{i,n}$ (i : die jeweilige Probe und n : Anzahl der verwendeten Gene) herangezogen werden. Der Normalisierungsfaktor $NF_{i,n}$ entspricht dem geometrischen Mittelwert der Expressionslevel a_i der ausgewählten Kontrollgene.

$$NF_{i,n} = \sqrt[n]{\prod_{j=1}^n a_{ij}} \quad (2.4)$$

3 Material und Methoden

3.1 Verwendeter Stamm *A. niger* AB1.13

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Stamm *Aspergillus niger* AB1.13 (der ursprünglich von der Arbeitsgruppe van den Hondel, Universität Leiden, NL stammt) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Stamm, welcher durch Zufallsmutagenese durch Bestrahlung mit UV-Licht entstanden ist. Für das Screening nach proteasedefizienten Stämmen diente eine Uridinauxotrophie als Selektionsmarker. Der Stamm *A. niger* AB1.13 ist demnach proteasedefizient, wodurch der Abbau der vom Pilz gebildeten Proteine durch pilzeigene Proteasen stark vermindert ist. Die Uridinauxotrophie resultiert aus einer Mutation des *pyrG*-Gens, so dass der Pilz keine Oritidylat-Decarboxylase mehr bilden kann und demzufolge auxotroph für das Ribonukleosid Uridin ist. Uridin wird allerdings für die RNA-Synthese benötigt, was die Zugabe von Uridin zum Medium zur Kultivierung von *A. niger* AB1.13 als precursor erfordert.

3.2 Modellprotein und -transkript

Als Modellprotein und -transkript für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche diente das vom Stamm *A. niger* AB1.13 hergestellte homologe Protein Glucoamylase, welches in Kapitel 2.2.3 näher beschrieben wurde sowie die für die Glucoamylase spezifische mRNA (*glaA*, siehe Kapitel 3.6).

Für die Suche nach geeigneten Referenzgenen wurden zusätzlich Transkripte anderer Gene von *A. niger* untersucht, deren Bezeichnung, Funktion und Zugangsnummer in Kapitel 3.6 aufgelistet sind.

3.3 Kultivierungsbedingungen

Der Pilz *A. niger* wurde unter verschiedenen Bedingungen in einem 22 L-Bioreaktor (Bioengineering AG) mit einem Arbeitsvolumen von 18,4 L kultiviert. Dabei erfolgte die Sauerstoffversorgung mittels Zugabe von sterilisierter Druckluft. Die Durchmischung des Reaktorinhaltes wurde durch drei 6-Blatt-Scheibenrührer gewährleistet. Bei den in dieser Arbeit betrachteten Kultivierungen wurden der pH-Wert (5,5), die Temperatur (30 °C) und die Begasungsrate ($9,2 \text{ L min}^{-1}$, entsprechend $0,5 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) konstant gehalten.

Weitere Informationen zum Bioreaktor und dessen Betriebsführung sind in der Publikation von Kelly et al. [58] enthalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen unterschieden sich durch die Art und Zugabe des Substrates, was in **Tabelle 3.1** dargestellt ist.

In den Kultivierungen 1 und 2 und 6 diente Xylose als Substrat für das Wachstum von *A. niger*. Nach 50 Stunden der Kultivierungszeit erfolgte eine Pulszugabe des Induktors Maltose.

Die Kultivierungen 3, 4 und 5 wurden in einem Glucosemedium durchgeführt. Glucose diente dabei einerseits als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und andererseits als Induktor.

Tabelle 3.1 Kultivierungsparameter im 22 L-Bioreaktor

Bezeichnung der Kultivierung	Substrat	Strategie der Substratzugabe
1	Xylose mit Maltosepuls nach 50 h	Batch
2	Xylose mit Maltosepuls nach 50 h	Batch
3	Glucose	Fedbatch
4	Glucose	Fedbatch
5	Glucose	Fedbatch

Zusammensetzung der Medien

Batch-Kultivierung: 10 g L⁻¹ Xylose, 0,244 g L⁻¹ Uridin, 0,2 g L⁻¹ MgSO₄, 1,65 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2,5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 100 µL L⁻¹ Spurenelementlösung [59]

Fedbatch-Kultivierung: 11 g L⁻¹ Glucose, 0,244 g L⁻¹ Uridin, 0,2 g L⁻¹ MgSO₄, 1,65 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2,5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 100 µL L⁻¹ Spurenelementlösung [59], ab 40 Stunden kontinuierliche Zugabe von 6,5 g L⁻¹ Glucose für weitere 40 Stunden.

Zusätzlich zu den in Tabelle 3.1 aufgelisteten Kultivierungen im 22 L-Bioreaktor wurden Batchkultivierungen in einem 3 L-Bioreaktor (Applikon) mit einem Arbeitsvolumen von 2 L durchgeführt, **Tabelle 3.2**. Auch hier dienten drei 6-Blatt-Scheibenrührer zur Durchmischung des Reaktorinhaltes. Die Begasung erfolgte mit sterilisierter Druckluft bei einer Begasungsrate von 1 L min⁻¹, entspricht 0,5 L L⁻¹ min⁻¹. Kultivierung 6 wurde ausschließlich mit Xylose als Kohlenstoffquelle durchgeführt, so dass keine Induktion der Glucoamylase-Synthese erfolgte.

Die Kultivierungen 7 und 8 wurden mit den Parametern wie in Tabelle 3.2 aufgezeigt durchgeführt.

Tabelle 3.2 Kultivierungsparameter im 3 L-Bioreaktor

Bezeichnung der Kultivierung	Substrat	Strategie der Substratzugabe	Zusätzliche Komponente
6	Xylose	Batch	
7	Glucose	Batch	130 µKat L ⁻¹ Glucoamylase
8	Glucose	Batch	450 µKat L ⁻¹ Glucoamylase

3.4 Kultivierungsbegleitende Analytik

3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung von Biotrockenmasse wurden Rundfilter (Sartorius, Filter Discs, Grade 389) verwendet, die zunächst ca. 20 h bei 105 °C getrocknet und deren Trockengewicht nach Abkühlen im Exsikkator bestimmt wurden. Anschließend wurden jeweils 10 mL der zu analysierenden Kulturbrühe mit Hilfe einer an einer Saugflasche angeschlossenen Wasserstrahlpumpe durch die Rundfilter filtriert und der entstandene Filterkuchen mit vollentsalztem Wasser gespült, um Reste von Medium zu entfernen. Danach wurde der Rundfilter mit Filterkuchen für mindestens 48 h bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator wurde dieser dann erneut gewogen. Die Differenz der Trockengewichte vom mit Biomasse beladenen und unbeladenen Rundfilter ergibt das Gewicht der in 10 mL Kulturbrühe enthaltenen Biomasse.

3.4.2 Bestimmung der Glucoamylaseaktivität

Die während der Kultivierungen von *A. niger* AB1.13 synthetisierte Glucoamylase wurde mit folgendem Enzymaktivitätstest quantifiziert. Dafür wurde die Enzymaktivität in bzw. an der Biomasse und im Kulturüberstand bestimmt. Der Kulturüberstand wurde dafür sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und das Filtrat für den Test eingesetzt. Für die Analyse der Enzymaktivität der Biomasse wurden zunächst 10 mL der Kulturbrühe entnommen, das Medium wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben abfiltriert und die Biomasse mit Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 4,8) nachgespült, um das Medium restlos zu entfernen. Anschließend wird die Biomasse nach Zugabe von 1 mL Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 4,8) in einer Mörsermühle (Retsch RMI) gemörsert. Nach 5 Minuten werden noch zusätzlich 9 mL Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 4,8) zur Biomasse hinzugefügt, wobei der Mörservorgang nicht unterbrochen wurde. Nach einer Gesamtmörserzeit von 6 Minuten wurde diese Suspension sterilfiltriert (Porengröße von 0,2 µm) und zur Analyse in den Enzymaktivitätstest eingesetzt.

Die Glucoamylaseaktivität wurde wie folgt bestimmt. Zunächst wurden pro Probe 3x 500 µL 0,1 %ige PNPG-Lösung (4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid) in je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zwei dieser Gefäße waren für die Doppelbestimmung und eins für die Blindwertbestimmung vorgesehen. In das Gefäß für die Blindwertbestimmung wurden noch zusätzlich 750 µL Boraxlösung (0,1 M Natriumtetraborat-Decahydrat) hinzugefügt. Die beiden Probengefäße wurden dann zusammen mit dem Blindwertgefäß im Thermoblock auf 60 °C erwärmt. Im Anschluss daran wurden 250 µL der zu analysierenden Probe dazu pipettiert und die Lösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 60 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 750 µL Boraxlösung abgestoppt. Danach wurde die Absorption der Proben bei 400 nm (A_{400}) gegen den jeweiligen Blindwert mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität der Glucoamylase wurde mittels Gleichung 3.1 ermittelt.

$$\text{Aktivität}_{\text{GAM}} [\mu\text{Kat} / \text{L}] = (A_{400} + 0,0385) / 0,01 \quad (3.1)$$

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Kohlenstoffquellen

Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Medienbestandteile und Kohlenstoffquellen Glucose, Maltose und Xylose zunächst mittels HPLC (**H**igh **P**erformance **L**iquide **C**hromatography) aufgetrennt und anschließend durch RI-Detektion (Brechungsindex, engl. **r**efraction **i**ndex) detektiert,

Tabelle 3.3. Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Probe mit Hilfe eines Laufmittels, der flüssigen Phase, über eine Trennsäule, die eine stationäre Phase enthält, mit hohem Druck transportiert wird. Kommt es zu einer Wechselwirkung eines Bestandteiles der flüssigen Phase mit der stationären Phase, verbleibt dieser bei der anschließenden Elution relativ zu anderen Bestandteilen lange in der Säule. Aufgrund dessen verlassen die einzelnen Bestandteile die Säule zu verschiedenen Zeitpunkten (den Retentionszeiten). Am Säulenende werden die Substanzen

mittels RI-Detektion erfasst. Die Konzentrationen dieser Substanzen werden letztlich über die Peakfläche oder -höhe und dem Vergleich mit ebenfalls gemessenen Standards bekannter Konzentration ermittelt.

Tabelle 3.3 Betriebsparameter und technische Daten

Interface:	D-7000, Fa. Merck Hitachi
Injektor:	Autosampler L-7200, Fa. Merck Hitachi
Injektionsvolumen:	10 µL
Pumpe:	Pump L-7110, isokratisch, Fa. Merck Hitachi
Elutionsmittel:	0,134 mL L ⁻¹ H ₂ SO ₄ (konzentriert)
Flussrate:	0,8 mL min ⁻¹
Säule:	Polyspher® OA HY, RT 125-4,6, Fa. Merck Hitachi
Detektor:	RI Detector L-7490; LaChrom, Fa. Merck Hitachi
Temperatur:	65 °C
Integration:	Peakfläche

3.5 Probenvorbereitung

3.5.1 Probennahme

Das verwendende Biomaterial wurde aus den Reaktoren entnommen und ein Teil für die in Kapitel 3.4 beschriebene Analytik direkt eingesetzt, während der andere Teil mittels einer an einer Saugflasche angeschlossenen Wasserstrahlpumpe durch einen Rundfilter (Satorius Filter Discs, Grade 389) filtriert wurde. Die auf dem Filter zurückgebliebene Biomasse wurde mit ca. 100 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung (4 °C) gewaschen. Danach wurden die Proben zunächst bei –80 °C zwischengelagert und im Anschluss daran ca. 72 Stunden bei –60 °C gefriergetrocknet. Die Aufbewahrung der getrockneten Biomasse erfolgte bei –80 °C.

3.5.2 Zellaufschluss

Die gefriergetrocknete Biomasse wurde mit einer Mörmühle für fünf Minuten gemörsert (Stahlmörser und -pistill, Pistilleinstellung: 1), wobei während des Mörservorgangs wiederholt flüssiger Stickstoff zur Probe hinzugegeben wurde. Anschließend wurde das pulverisierte Material mit einem sauberen Spatel in ein RNase-freies Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.3 DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung aus der Biomasse von *A. niger* wurde mit Hilfe eines DNA-Aufreinigungskits für Pflanzen und Pilze (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) durchgeführt. Zu Beginn wurden 1-2 Spatelspitzen des gemörserten Pilzmaterials in ein steriles und RNase freies Gefäß überführt und nach Zugabe von 400 μL Lysepuffer und 4 μL RNase A-Stocklösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 65°C die Zellen lysiert und enthaltene RNA durch RNasen verdaut. Nach Fällung der Detergenzien, Proteine und Polysacchariden und Abtrennung dieser Bestandteile mittels QiaSchredder-Säule, erfolgte die Bindung der DNA an die Silicagel-Membran einer DNA-Adsorptionssäule (Qiagen Dneasy mini Säule), siehe Herstellerprotokoll. Die sich anschließenden Waschschritten wurden ebenfalls wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Gewinnung der DNA erfolgte anschließend in zwei gleichen Elutionsschritten, in welchen jeweils die membrangebundene DNA mit 100 μL Elutionspuffer (AE) welcher eine Temperatur von 65°C hatte durch Zentrifugieren der DNA-Bindungssäule für 1 Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute heruntergewaschen wurde. Die so gewonnene DNA wurde anschließend bei -20°C für eine kurzzeitige Lagerung und bei -80°C für eine Langzeitlagerung bis zur nächsten Verwendung aufbewahrt.

3.5.4 RNA-Aufreinigung

Die Gewinnung und Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem RNA-Aufreinigungskit für Pflanzen und Pilze (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Zu Beginn wurden 450 μL Lysepuffer (RLC), welcher zuvor mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde (10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ β -Mercaptoethanol), in ein steriles, RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 1-2 Spatelspitzen gemörserstes Probenmaterial zum Lysepuffer gegeben, sofort gründlich gemischt und wie im Herstellerprotokoll beschrieben weiterverfahren. Das Herstellerprotokoll enthält einen DNA-Verdau, welcher ebenfalls nach Protokoll durchgeführt wurde. Das Herunterwaschen der Gesamt-RNA von der RNA-Bindungssäule (RNeasy mini Säule) erfolgte in zwei gleichen Schritten mit jeweils 20 μL RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren der Bindungssäule (RNeasy mini Säule), welche zuvor in ein RNase freies Gefäß integriert wurde, für 2 Minuten bei 10.500 Umdrehungen pro Minute. Um sicherzustellen, dass keine DNA-Kontamination im Eluat vorlag, wurde vom Herstellerprotokoll abweichend ein weiterer DNA-Verdau direkt im Eluat durchgeführt. Dafür wurden zur RNA-Lösung 2,5 μL DNase I und 10 μL Puffer (RDD) gegeben und der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 μL aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 60 Minuten wurde die RNA aus diesem Ansatz wie oben beschrieben mittels RNA-Adsorptionssäule (RNeasy mini Säule) aufgereinigt. Die so erhaltene RNA-Lösung wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.5 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die in der reversen Transkription (RT) erzeugte cDNA repräsentiert die in der Gesamt-RNA-Probe enthaltene mRNA.

Um verschiedene RNA-Proben besser vergleichen zu können, werden diese vor der RT auf eine Gesamt-RNA-Konzentration von ca. 50 ng μL^{-1} eingestellt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt anschließend mittels

Spektrophotometrie bei 260 nm (NanoDrop® ND-6000). Die Reinheit der Gesamt-RNA wird dabei über das Verhältnis der Spektral-Absorptionen bei 260 nm und 280 nm definiert. Das Verhältnis einer reinen RNA-Lösung beträgt $2,0 \pm 0,15$. Die auf eine Konzentration von ca. $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ verdünnten RNA-Proben wurden anschließend in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die RT erfolgte im i-Cycler iQ™ der Firma Bio-Rad. Das dafür verwendete Protokoll ist in **Tabelle 3.4** und **Tabelle 3.5** dargestellt.

Tabelle 3.4 Bestandteile eines RT-Reaktionsansatzes (50 μL Gesamtvolumen)

Bestandteile	Konzentration	Volumen [μL]
Oligo dT20-Primer (50 μM)	2,5 μM	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 mM	2,5
Gesamt-RNA-Lösung (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	1,38 μg	27,5
RT-Puffer (5 fach)	1fach	10
DTT (0,1 M)	5 mM	2,5
RNAseOUT (40 U μL^{-1})	100 U	2,5
SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U μL^{-1})	500 U	2,5

Tabelle 3.5 Temperatur- und Zeitprogramm der RT

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Inkubationszeit [min]	Reaktion
65	5	Aufhebung von Sekundärstrukturen
50	50	Reverse Transkription
70	15	Inaktivierung der Reverse Transkriptase

Um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, wurden die Gesamt-RNA-Lösung, Primer und dNTPs laut Herstellerprotokoll für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 Minute auf Eis abgekühlt, um ein Hybridisieren der Oligo dT₂₀-Primer zu ermöglichen. Danach wurden dem Ansatz die restlichen Komponenten zugefügt und die RT für 50 Minuten bei 50°C durchgeführt. Durch einen 15 minütigen Inkubationsschritt bei 70°C wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert und dadurch die Reaktion gestoppt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C .

3.6 Sequenzsuche

Für die Quantifizierung von spezifischer mRNA für verschiedene Gene aus *Aspergillus niger* wurden zunächst die zugehörigen DNA-Sequenzen benötigt (**Tabelle 3.6**). Für die Suche nach Nukleinsäuresequenzen wurde im Internet die Datenbank des Europäischen Molekularbiologischen Instituts (EMBL) des European Bioinformatics Institute (EBI) genutzt (www.ebi.ac.uk/embl/). Eine weitere Datenbank, SWISS-PROT (www.expasy.ch/sprot), diente der Suche nach Sequenzen von Housekeeping-Genen von *A. niger*. SWISS-PROT ist eine Proteindatenbank, die von der Universität Genf zusammen mit der EMBL-Datenbank des EBI zur allgemeinen Nutzung zur Verfügung gestellt wird. Die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Proteine wurden dann durch SWISS-PROT-Querverweise zum EMBL erhalten. Zusätzlich wurde ein Sequenzvergleich mit der Internetdatenbank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) durchgeführt, um Sequenzhomologien zu anderen Organismen auszuschließen. Erst danach erfolgte das Primer- und Sondendesign für die ausgesuchten Gensequenzen.

Tabelle 3.6 Gene für die Genexpressionsanalyse

Gen	Zugangsnummer	Protein	Funktion
<i>aldA</i>	M32351	Aldehyd-Dehydrogenase	Oxidation von Aldehyd- oder Ketogruppen
<i>apsC</i>	AJ316576	Aminopeptidase C	Sequentielle Spaltung von Aminosäuren ausgehend vom N-Terminus
<i>act</i>		Actin (Homologie zu <i>Aspergillus nidulans</i> [60])	Strukturprotein des Cytoskeletts
<i>citA</i>	AJ243204	Citratsynthase	Kondensation von Acetyl CoA mit Oxalacetat im Citronensäurezyklus
<i>cox5</i>	AJ132229	Cytochrom C Oxidase, Untereinheit V	Hochkonservierter Enzymkomplex in der Atmungskette
<i>gapdh</i>	X99652	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Oxidation und Phosphorylierung von Glycerinaldehydphosphat durch NAD ⁺ und P in der Glykolyse
<i>glaA</i>	X00712	Glucoamylase	Hydrolyse von α -1,4, α -1,6 und α -1,3-glycosidischen Bindung
<i>glkA</i>	X99626	Glucokinase	Phosphorylierung von Glucose in der Glykolyse
<i>gndA</i>	AJ551178	6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase	Oxidative Decarboxylierung von 6-Phosphogluconsäure zu Ribulose-5-Phosphat und CO ₂ im Pentosephosphatzyklus
<i>gspd</i>	X87942	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton im Pentosephosphatzyklus
<i>hxx</i>	AJ009973	Hexokinase	Phosphorylierung von Hexosen
<i>icdA</i>	AB000262	Isocitrat-Dehydrogenase	Oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat im Citronensäurezyklus
<i>oahA</i>	AJ567910	Oxalacetat Acetylhydrolase	Hydrolyse von Oxalacetat zu Oxalat und Acetat
<i>pepD</i>	L19059	Subtilisin ähnliche Protease	Protease
<i>pfkA</i>	Z79690	Phosphofructokinase	Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat durch ATP in der Glykolyse
<i>pgiA</i>	AJ551177	Phosphoglucose-Isomerase	Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat in der Glykolyse
<i>pyc</i>	AJ009972	Pyruvat-Carboxylase	Biotin-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat in der Gluconeogenese
<i>sarA</i>	Z67742	Sekretion assoziiertes, Ras-Protein, verwandtes GTP-Bindeprotein	GTP-Bindeprotein, mit Beteiligung an der Proteinsekretion

3.7 Primerdesign

Alle Primer wurden mit dem im Internet zur Verfügung gestellten Programm Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) konstruiert. Dazu wurden jeweils die gewünschten Parameter wie die Anlagerungstemperatur, die Produktlänge des Amplifikates und der Sequenzbereich festgelegt. Im Gegensatz zur mRNA besteht die DNA-Sequenz aus kodierenden Bereichen (Exons), die durch nicht kodierende Bereiche (Introns) unterbrochen sind. Auf Ebene der RNA sind keine Introns mehr vorhanden. Da genomische DNA in den RNA- bzw. cDNA-Proben das Ergebnis der Quantifizierung erheblich verfälschen würde, wurde das jeweilige Primerpaar so gewählt, dass der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer jeweils in verschiedenen Exons bindet und somit die Intronsequenz umspannt wird (**Tabelle 3.7**). Aus diesem Grund waren bei entsprechendem Primerdesign PCR-Amplifikate, welche aus cDNA-Ausgangsmaterial (respektive mRNA) synthetisiert wurden, kürzer, als aus genomischer DNA entstandene, so dass nach der PCR überprüft werden konnte, ob das Ausgangsmaterial frei von genomischer DNA war.

Zusätzlich wurden der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer auf Sequenzkomplementaritäten überprüft, um die Zusammenlagerung von Primern und eine damit verbundene Konkurrenzsituation in der späteren PCR auszuschließen. Dafür wurde das Programm der Firma Operon Biotechnologies (www.operon.com/oligos/toolkit.php), welches im Internet zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Zunächst wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Primerpaar konstruiert. Diese Primer wurden dann in die qualitative PCR eingesetzt (Kapitel 3.8.1) und die Funktionsfähigkeit anhand der PCR-Produktausbeute und Größe der jeweiligen Amplifikate nach anschließend durchgeführter Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung beurteilt.

LUX™-Primerdesign

Die Primersuche für die LUX™ (Light Upon eXtension)-Primer-Technologie erfolgte mit einem Primersuchprogramm der Firma Invitrogen (www.invitrogen.com → Custom Primers → LUX™-Primer → Primer Design and Ordering). Dazu wurden die gewünschten Parameter wie die Anlagerungstemperatur, die Produktlänge und die in Tabelle 3.7 aufgezeigten Sequenzbereiche festgelegt. Die verwendeten LUX™-Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen (siehe Tabelle 3.7). Die im lyophilisierten Zustand gelieferten Primer werden in RNase- freiem Wasser (Firma ROTH) aufgenommen und vor Einsatz in die PCR auf eine Konzentration von $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ verdünnt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3.7 Primersequenz der jeweiligen Gene sowie die zugehörige PCR-Produktlängen.

Gen	Primersequenz 5' → 3'	PCR-Produktlänge bei cDNA [bp]	PCR-Produktlänge bei DNA [bp]
<i>apsC</i>	VP: CCTGGAGAAGGGCGAGTTC	229	280
	RP: AATGACGGCAATGCTGGTG		
	RP-LUX: caccaAATGACGGCAATGCTGGTG		
<i>act</i>	VP: GGTCTGGAGAGCGGTGGTAT	170	232
	RP: GAAGAAGGAGCAAGAGCAGTG		
	RP-LUX: cactgcGAAGAAGGAGCAAGAGCAGTG		
<i>cox5</i>	VP: GACCAAGGAGTGGCAGGAG	224	313
	RP: GGTGGGAGGCAGCAGTTC		
	RP-LUX: gaactgGGTGGGAGGCAGCAGTTC		
<i>gapdh</i>	VP: CCCTTCATCGAGACCCACTAT	101	177
	RP: ACAATCAGACCCTCCTCGTAG		
	RP-LUX: ctacgaACAATCAGACCCTCCTCGTAG		
<i>glaA</i>	VP: GACAAGCAGGGGTCGTTG	267	325
	RP: GGTCAGCAGAGCAGCATAAGA		
	VP-LUX: caacgGACAAGCAGGGGTCGTTG		
<i>glkA</i>	VP: TGAGGTGCAGCGTGGAGT	210	269
	RP: TGGGTAAGGGAGAAGGTAGTGTC		
	RP-LUX: gacactaTGGGTAAGGGAGAAGGTAGTGTC		
<i>gspd</i>	VP: GTGTTGACGCTGCTCGCTAT	240	292
	RP: CCACCTCTCGTTCTTGATGTAG		
	RP-LUX: ctacataCCACCTCTCGTTCTTGATGTAG		
<i>icdA</i>	VP: GTATGGTGTCTGGTGTCAAGTG	136	240
	RP: GGGTTCACGGAAGACGGTA		
	VP-LUX: cacttgGTATGGTGTCTGGTGTCAAGTG		
<i>pfkA</i>	VP: CCCTCACTCGCATCTGTG	232	288
	RP: CTACGCTTTCCACGCTCCTT		
	VP-LUX: cacagaCCCTCACTCGCATCTGTG		
<i>pgiA</i>	VP: AGGTCAACGGAAGAGCGTC	183	240
	RP: GCTTCAGAGCCTCGGTAC		
	VP-LUX: gacgcAGGTCAACGGAAGAGCGTC		
<i>sarA</i>	VP: ACGGGTAAGGGCAAGGTTTC	163	227
	RP: TCGCAACAATAAAGTCAACAGC		
	VP-LUX: gaacctACGGTAAGGGCAAGGTTTC		

3.8 Echtzeit-PCR

Mittels Echtzeit-PCR erfolgte die Quantifizierung spezifischer mRNA verschiedener Gene. Für die Studien der Genexpression kam dabei ausschließlich die LUX™-Primer-Technologie zum Einsatz. Zunächst wurden die in Tabelle 3.7 genannten Primerpaare in eine quantitative PCR eingesetzt, um die Primer auf ihre Funktionalität zu testen und die gebildeten Amplifikate hinsichtlich ihrer erwarteten Größe zu überprüfen.

3.8.1 Protokoll der qualitativen PCR

Für die PCR wurde zunächst ein Ansatz hergestellt, der alle Komponenten außer der cDNA-Probe enthielt, **Tabelle 3.8**. Von diesem Ansatz wurden jeweils 23 μL in die PCR-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von je 2 μL der cDNA-Probe pro Reaktionsansatz erfolgte die Inkubation des Ansatzes nach dem in **Tabelle 3.9** aufgelistetem Temperatur- und Zeitprogramm. Jeder PCR-Lauf enthielt zusätzlich einen Reaktionsansatz, welcher statt der cDNA-Probe Wasser enthielt und als Blindwert diente. Für die Überprüfung der Größe der so entstandenen Amplifikate wurde nach dem PCR-Lauf eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 3.11). Primer, die zur Bildung von Amplifikaten der für cDNA erwarteten Größe führten und deren Produkte starke Banden im Gel ergaben, wurden als geeignet bewertet.

Tabelle 3.8 Bestandteile eines PCR-Reaktionsansatzes (25 μL Gesamtvolumen).

Bestandteile	Konzentration im Ansatz	Volumen [μL]
Wasser		16,8
PCR-Puffer (10fach)	1 fach	2,5
MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	4 mM	2,0
dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM	0,5
Vorwärtsprimer (10 μM)	0,2 μM	0,5
Rückwärtsprimer (10 μM)	0,2 μM	0,5
Platinum -Polymerase (5 U μL^{-1})	1 U	0,2
cDNA-Probe 1:10 verdünnt		2,0

Tabelle 3.9 Temperatur- und Zeitprogramm der qualitativen PCR.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Reaktion	Zyklen
96	60	Denaturierung	1
95	20	Denaturierung	45
60	30	Hybridisierung	
72	120	Primerverlängerung	
72	120	Zusätzliche Verlängerung	1

3.8.2 Herstellung der Standards für die Kalibrierung

Als Standards dienten DNA-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Diese Lösungen bekannten Gehaltes wurden in die Echtzeit-PCR eingesetzt und die somit erhaltenen X_{SDM} -Werte (Kapitel 2.3.2) über dem Logarithmus der DNA-Konzentrationen aufgetragen und so eine Kalibriergerade erstellt. Dabei korreliert der X_{SDM} -Wert invers mit der Menge an DNA, welche in die Echtzeit-PCR eingesetzt wird. Bei diesen Kalibrierungsstandards handelte es sich um sogenannte DNA-Amplifikate, die aus DNA Fragmenten der zu quantifizierenden Zielsequenz bestehen und mittels qualitativer PCR vervielfältigt und anschließend aufgereinigt und aufkonzentriert wurden. Für jede zu quantifizierende cDNA-Spezies wurde durch Vervielfältigung von cDNA der entsprechenden Sequenz mittels PCR eine DNA-Standardlösung hergestellt.

Aus den in Tabelle 3.8 dargestellten Reaktionskomponenten wurde zunächst ein Gesamt-PCR-Ansatz (6 mal 50 μ L) hergestellt. Von diesem Mastermix wurden anschließend 50 μ L in die PCR-Reaktionsgefäße überführt. Jeder PCR-Lauf enthielt noch zusätzlich einen Reaktionsansatz, der statt cDNA Wasser enthielt und als Blindwert diente.

Nach der Vervielfältigung der spezifischen Sequenzen mit Hilfe der PCR mit dem in Tabelle 3.9 gezeigten Temperatur- und Zeitprogramm folgten die Aufreinigung und die Aufkonzentrierung dieser Amplifikate.

Für die Herstellung von reinsten DNA-Standards wurden die Amplifikate zunächst von Enzymen, Nukleotiden, Primern und Salzen befreit. Dieses erfolgte mit einem PCR-Aufreinigungs-Kit (Min Elute PCR Purification, Qiagen). Zu Beginn wurden in sechs Reaktionsgefäße je 50 µL-Ansätze (300 µL Gesamtvolumen) zu 1,5 mL des Bindungspuffers (PB) gegeben und vermischt. Die Suspension von jeweils drei Reaktionsgefäßen wird auf eine DNA-Aufreinigungssäulen (MinElute-Säule) pipettiert und für 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um die DNA an die Membran zu binden. Das Filtrat wurde verworfen. Im Anschluss daran wurde die Membran mit 750 µL ethanolhaltigem Puffer (Waschpuffer PE) gewaschen und 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Membran bei 13.000 Umdrehungen pro Minute für 2 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt und für 10 Minuten luftgetrocknet, um Ethanol restlos zu entfernen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit je 10 µL bideionisiertem, RNase-freiem Wasser (Firma Roth), welches direkt auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert wurde. Nach einminütiger Inkubation wurde die Säule für 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dieser Elutionschritt wurde viermal wiederholt, so dass insgesamt zweimal 40 µL Eluat erhalten wurden.

Im Anschluss daran erfolgte die Separierung der aufgereinigten DNA durch Gelelektrophorese. Hierzu wurden die Eluate zu einem Gesamteluat (50 µL) zusammengefügt und mit 10 µL Ladepuffer versetzt. Von dieser Mischung wurden 30 µL in 1,5 cm breite Taschen eines 2,5%igen Agarosegels pipettiert und eine Spannung von ca. 100 V für 1,5 Stunden angelegt, wobei die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Die Gelelektrophorese ermöglicht die Separierung von DNA-Molekülen ihrer Größe nach, wodurch die Größe der aufgetragenen DNA-Moleküle abgeschätzt werden konnte. Weiterhin konnte die jeweilige Zielbande identifiziert werden, indem ebenfalls ein Längenmarker mit unterschiedlichen Nukleinsäuremolekülen bekannter Größe aufgetrennt wurde.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg L^{-1}) für 30 Minuten inkubiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff und wird zur Detektion von DNA-Fragmenten nach der Gelelektrophorese eingesetzt. Diese UV-aktive Substanz interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA-Doppelhelix, wodurch sich seine Fluoreszenzintensität stark erhöht und somit DNA-Fragmente im Gel mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Die gewünschten Fragmente wurden anschließend auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und ihr Gewicht bestimmt. Die Aufreinigung des DNA-Fragments erfolgte mit einem DNA-Aufreinigungskit (Gel Extraction Kit, Qiagen), welches die DNA von der Agarose trennt und aufreingt. Die Aufreinigung wurde wie vom Hersteller vorgeschlagen durchgeführt.

Die somit gewonnenen DNA-Lösungen wurden jeweils auf eine Konzentration von $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ eingestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch ein NanoDrop®-Spektrophotometer. Aus dieser DNA-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe definierter Konzentrationen hergestellt. Diese Standards wurden dann in die Echtzeit-PCR eingesetzt und dienten der Erstellung einer Kalibriergeraden. Vor jeder Quantifizierung wurde der Kalibrierbereich der zu untersuchenden Proben abgeschätzt. Dafür wurden zunächst Standards mit einem weiten DNA-Konzentrationsbereich sowie die Proben in die Echtzeit-PCR eingesetzt.

3.8.3 Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR

In dieser Arbeit wurden die in Kapitel 2.3 bereits vorgestellten LUX™-Primer für die quantitative Echtzeit-PCR verwendet. Bei dieser Technik wird ein sequenzspezifisches Primerpaar verwendet, wobei ein Primer dieses Primerpaares mit einem Fluoreszenzfarbstoff FAM (5-Carboxyfluorescein) gekoppelt ist. FAM wird bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm.

Für die Echtzeit-PCR-Messung wurde das Gerät iCycler iQ™ der Firma Biorad genutzt, in dem alle Versuche durchgeführt wurden. Die Datenaufnahme erfolgte bei 84 °C, da bei dieser Temperatur keine unerwünschten kurzen Nebenprodukte wie beispielsweise Primerdimere bei der online-Datenaufnahme mit erfasst werden (Kapitel 4.1.3).

In die Echtzeit-PCR eingesetzte Komponenten sind in **Tabelle 3.8** aufgeführt. Allerdings wurde hier statt des Vorwärtsprimers der fluorszenzmarkierte Vorwärtprimer LUX™-Primer verwendet (Tabelle 3.7). Die Echtzeit-PCR wurde mit folgendem Temperatur- und Zeitprogramm durchgeführt.

Tabelle 3.10 Temperatur- und Zeitprogramm der quantitativen Echtzeit-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Reaktion	Anzahl der Zyklen
96	60	Denaturierung	1
95	20	Denaturierung	45
60	30	Hybridisierung	
72	120	Primerverlängerung	
84	15	Aufnahme der Fluoreszenzdaten	
72	135	Zusätzliche Verlängerung	1

3.8.4 Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten

Die Bestimmung der Menge an cDNA oder DNA, welche zu Beginn in die PCR eingesetzt wurde, kann einerseits über den Ct-Wert oder über den X_{SDM} -Wert erfolgen (Kapitel 2.3.2). Wenn nicht anders angegeben, wurde nach der Echtzeit-PCR-Messung und Festlegung des Fluoreszenzschwellenwertes der Ct-Wert durch die iCycler iQ™-Software (Biorad) für jede Probe ermittelt. Dabei wurde der Fluoreszenzschwellenwert so festgelegt, dass er die PCR-Kurve einerseits noch in dem exponentiellen Bereich schnitt, andererseits aber deutlich oberhalb des Grundrauschens des PCR-Signals lag.

Die Bestimmung des X_{SDM} -Wertes erfolgte ebenfalls anhand der online-Echtzeit-PCR-Kurve. Der X_{SDM} -Wert ist das Maximum der zweiten Ableitung der sigmoidalen PCR-Kurve, welches den Wendepunkt der ersten Ableitung dieser Kurve repräsentiert und somit ein charakteristischer Wert für diese ist.

Für die Berechnung des X_{SDM} -Wertes schlagen Tichopad et al. [64] zunächst eine vierparametrische Kurvenanpassung nach der folgenden Gleichung vor.

$$y = \frac{a}{1 + (x / x_0)^b} + y_0 \quad (3.2)$$

- a = Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz und Grundfluoreszenz
- x_0 = X-Wert des Maximums der ersten Ableitung
- y_0 = Grundfluoreszenz
- b = Exponent

Die Berechnung des Maximums der zweiten Ableitung (X_{SDM}) erfolgt dann, indem die dritte Ableitung der Gleichung 3.2 gebildet wird. Der Funktionswert der dritten Ableitung wird Null gesetzt und der dazugehörige X-Wert, welcher dem X_{SDM} -Wert entspricht, berechnet. Dazu wurde folgende von Tichopad et al. [38] vorgeschlagene Gleichung eingesetzt.

$$x_{SDM} = x_0 \cdot b \sqrt[3]{\frac{2 \cdot (1 - b^2) - \sqrt{3b^2 \cdot (b^2 - 1)}}{-b^2 - 3b - 2}} \quad (3.3)$$

Die von Tichopad et al. [38] vorgeschlagene Bestimmung des X_{SDM} -Wertes wurde wie folgt umgesetzt:

Für die Berechnung der Grundfluoreszenz der jeweiligen Kurve wurde zunächst aus den PCR-Rohdaten ein Anfangsbereich festgelegt, in dem die Fluoreszenz

relativ konstant war. Diese Fluoreszenzwerte dienten zur Berechnung der Grundfluoreszenz, welche anschließend von den PCR- Rohdaten subtrahiert wurde. Dadurch kam es zu einer Verschiebung der Kurve und die Anfangsfluoreszenz war nahezu Null und konstant. Mittels iCycler iQTM-Software wurden im Anschluss daran neue Wertepaare der Funktion berechnet und eine Kurvenanpassung mit Hilfe des Computer Programms Origin (Typ: „Growth/Sigmoidal-logistic“) durchgeführt. Die Funktionsgleichung dafür lautet wie folgt:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (3.4)$$

A₁ = Grundfluoreszenz

A₂ = maximale Fluoreszenz

X₀ = x-Wert des Maximums der ersten Ableitung

p = Exponent

Durch das Ersetzen und Umformen folgender Parameter

$$A_1 - A_2 = -a$$

$$A_2 = y_0 + a$$

wurde Gleichung 3.4 in die Form der Gleichung 3.5 gebracht.

$$y = \frac{a}{1 + (x/x_0)^{-p}} + y_0 \quad (3.5)$$

Ein Vergleich der von Tichopad et al. [38] vorgeschlagenen Gleichung 3.2 mit der aus der Kurvenanpassung des Computerprogramms Origin resultierenden Gleichung 3.5 zeigt, dass es sich um die gleiche Gleichung handelt, wenn $-p = b$ gesetzt wird.

Der Wert für X_0 und b , welcher sich aus der Kurvenanpassung (Gleichung 3.4) ergab wurde in die Gleichung 3.3 eingesetzt und der X_{SDM} -Wert für diese Kurve berechnet.

Im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit wurde ein Excel-Makro erstellt, mit dem die Berechnung automatisiert werden konnte, so dass nur das Einfügen der Rohdaten, welche mit dem iCycler gewonnen wurden, die Auswahl der zur Berechnung der Grundfluoreszenz zu nutzenden Daten sowie des für die Kurvenanpassung zu verwendenden Datenbereiches erforderlich sind.

3.8.5 mRNA-Quantifizierung durch Echtzeit-PCR

In dieser Arbeit wurden genspezifische mRNA quantifiziert, einerseits für das Glucoamylasegen *glaA* und andererseits für 10 weitere Gene die als Referenzgene zur Normalisierung der Genexpressionsdaten dienen. Dabei wurde cDNA aus verschiedenen Kultivierungen wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben hergestellt und für die Quantifizierung eingesetzt, wobei hier für die Genexpressionsanalysen des Glucoamylasegens und für die Expressionsanalysen der 10 Housekeeping-Gene jeweils die gleichen cDNA-Proben verwendet wurden. Zur quantitativen Bestimmung wurde die mRNA bzw. cDNA in einem separaten Echtzeit-PCR-Lauf eingesetzt und je nach eingesetzten spezifischen Primern die gewünschte Gensequenz amplifiziert. Die Auswertung dieser Daten erfolgte wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben entweder über den Ct- Wert oder über den X_{SDM} -Wert. Dabei wurde für jede spezifische mRNA ein Lauf durchgeführt, der zusätzlich noch Standards enthält. Diese Standards bekannter Konzentrationen wurden wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben für jedes Gen bzw. für die genspezifische mRNA hergestellt und wie die Proben ausgewertet.

Aus den somit ermittelten X_{SDM} - oder Ct-Werten der Standards bekannter DNA-Konzentration wurde eine Kalibriergerade erstellt. Mit Hilfe der sich ergebenden Geradengleichung wurde über die ermittelten X_{SDM} - oder Ct-Werte der jeweiligen Proben deren Konzentration an cDNA bestimmt, welche der Menge an spezifischer mRNA der Probe entspricht. Anhand der Kalibriergeraden kann

zusätzlich über die Steigung s dieser Geraden die Effizienz E der PCR-Reaktion ermittelt werden (Gleichung 3.6). Dabei bedeutet eine Effizienz von 2 eine Verdoppelung der Anzahl der DNA-Amplifikate in jedem Zyklus. Die Effizienz wurde hier lediglich als Anhaltspunkt zur Beurteilung der PCR herangezogen.

$$E = 10^{(-1/s)} \quad (3.6)$$

3.9 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung und Dokumentation der Nukleinsäurekonzentration sowie die Überprüfung der Reinheit erfolgte mittels UV-VIS Spektrophotometer (Spektrophotometer ND-1000, NanoDrop Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Reinheit der DNA- und Gesamt-RNA Lösung wurde dabei über das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm definiert. Bei einer Wellenlänge von 280 nm werden Proteine detektiert. Das Verhältnis der Absorption beträgt bei einer reinen DNA-Lösung $1,8 \pm 0,15$ und bei einer reinen Gesamt-RNA-Lösung $2,0 \pm 0,15$ [61], [62].

3.10 Schmelzpunktanalyse

Um die Qualität der quantitativen Echtzeit-PCR hinsichtlich der entstandenen PCR-Amplifikate zu überprüfen, besteht die Möglichkeit, eine Schmelzpunktanalyse mit den in der PCR generierten PCR-Produkten durchzuführen. Anhand dieser Schmelzpunktanalyse können unspezifische Produkte, wie zusammengelagerte Primer und DNA-Kontaminationen in den Proben festgestellt werden. Hierzu wird im iCycler-Programm der Programmpunkt Schmelzpunktanalyse ausgewählt. Bei der Schmelzpunktanalyse

werden die PCR-Produkte in mehreren Zyklen einem Temperaturgradienten (siehe **Tabelle 3.11**) ausgesetzt und dabei das Fluoreszenzsignal der Signalgeber aufgenommen. Der Schmelzpunkt der PCR-Produkte ist dabei von der Sequenz und der Länge der Nukleinsäurekette abhängig, so dass jeder DNA-Doppelstrang bei einer charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur, in seine zwei Einzelstränge zerfällt und die entstandenen PCR-Produkte verschiedener Länge erkannt werden können, da eine Unterscheidung anhand der Fluoreszenzabnahme bei Zunahme der Temperatur möglich ist.

Tabelle 3.11 Temperaturprogramm für die Schmelzpunktanalyse

Zyklus	Wiederholung	Temperaturbereich [°C]	Zeit [s]
1	1	72	120
2	1	95	60
3	80	55 bis 94°C (in 0,5 K Schritten)	Je 10

3.11 Agarosegel-Elektrophorese

Für die qualitative Analyse der Nukleinsäuren wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Die Gelelektrophorese ist ein biophysikalisches Trennverfahren, bei welchem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Nukleinsäuremoleküle besitzen eine negative Nettoladung, weswegen diese Moleküle in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Dabei benötigen kleinere Moleküle in einer Agarosegelmatrix eine kürzere Zeit für die Strecke zum positiven Pol als größere Moleküle, was deren Auftrennung ihrer Größe entsprechend ermöglicht. Weiterhin kann mit dieser Methode die Größe der Nukleinsäuremoleküle abgeschätzt werden, indem eine so genannte DNA-Leiter, welche DNA-Fragmente definierter Größe enthält, parallel mit der zu bestimmenden Probe aufgetragen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse von Nukleinsäuremolekülen 2,5 % ige Agarosegele verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Proben zunächst mit Ladepuffer (Triple Dye Loading Buffer, Cambrex Bioscience) versehen, wie vom Hersteller vorgeschlagen. Anschließend wurden 10 μL der mit Ladepuffer versehenen Proben auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde dann bei 100 mV für ca. eine Stunde in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Agagel Maxi, Biometra®) durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer, mit welchem auch die Agarosegele hergestellt wurden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel in einem Ethidiumbromidbad ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 20-30 Minuten inkubiert. Nach kurzem Waschen des Gels konnten die Nukleinsäuremolekül-Fragmente auf einem UV-Tisch (UVP, Ultra-Violet-Products) (Anregung: 360 nm, Emission: 590 nm) sichtbar gemacht werden.

3.12 Datenverarbeitung zur Auswahl von Referenzgenen

Die Bestimmung von Referenzgenen erfolgte wie in Kapitel 2.5 beschrieben nach Vandessompele et al. [1].

Die zu untersuchenden Proben wurden mittels eines jeweils für das Gen spezifischen Primerpaares (Kapitel 3.7) in die Echtzeit-PCR eingesetzt (Kapitel 3.8.3) und die so erhaltenen Echtzeit-PCR Daten anschließend mit Hilfe des X_{SDM} -Wertes und der Geradengleichung ausgewertet (Kapitel 3.8.5).

Nach Vandessompele et al. [1] werden wie in Kapitel 2.5 beschrieben zur Berechnung der Menge A_{jk} der Kontrollgene die zur Basis 2 logarithmierten Verhältnisse der Expressionsdaten ($\log_2(a_{ij}/a_{ik})$, i: Probe; j und k: Kontrollgene, dabei gilt $j \neq k$) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden statt der logarithmierten Verhältnisse der Expressionsdaten die Differenzen der X_{SDM} -

Werte gebildet, die dann als Elemente der Menge A_{jk} eingesetzt wurden [1]. Das statt der Verhältnisse der Expressionslevel auch die Differenz der X_{SDM} -Werte der zu vergleichenden Gene zur Berechnung der Menge A_{jk} herangezogen werden kann, wird im Kapitel 6.3. gezeigt. Dabei gilt, dass der Expressionslevel a_{ij} eines Gens die Konzentration C dieses Gens ist.

Dabei ergaben sich aus jeder Kombination zweier Referenzgene für einen Probenumfang von m Proben auch m X_{SDM} -Differenz-Werte, die dann eine Menge A_{jk} bildeten. Für n Referenzgene ergaben sich dann $\sum_{k=1}^{n-1} k$ Genkombinationen und somit ebenso viele Elemente der Menge A_{jk} . Für diese Menge A_{jk} wurde dann jeweils eine Standardabweichung gebildet, wodurch sich ebenfalls $\sum_{k=1}^{n-1} k$

Standardabweichungen V_{jk} ergaben. Danach erfolgte die Bestimmung der Genstabilitätsmaße M für jedes Gen nach der Gleichung 2.3. Wurde ein hoher Wert für M erhalten, welches einer hohen mittleren Standardabweichung entspricht, wurde dieses Gen aufgrund einer instabilen Expression dieses Gens für die weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Für alle noch verbliebenen Gene wurde dann erneut jeweils der M -Wert bestimmt, wobei der Wert für die Standardabweichung des ausgeschlossenen Gens nicht mehr in die M -Wert-Berechnung mit einbezogen. Dies wurde so lange durchgeführt, bis letztlich drei Gene übrig blieben, die in den untersuchten Proben entsprechend ihrer M -Werte die stabilste Expression aufwiesen und deshalb zur Berechnung eines Normalisierungsfaktors NF_3 verwendet wurden. Der Normalisierungsfaktor NF_3 wurde nach Gleichung 2.4 für $n=3$ berechnet.

Zusätzlich wurden die errechneten M -Werte aller Gene mittels des von Vandesompele im Internet (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) zur Verfügung gestellten Visual Basic Application für Microsoft Excel, zum Auffinden von Referenzgenen überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Genexpressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR

Die Mengen der unterschiedlichen Transkripte (mRNA-Kopien) einer Zelle variieren, was unter anderem durch sich ändernde Bedingungen und Einflüsse, denen die Zellen ausgesetzt sind, verursacht wird. Einen großen Einfluss dabei haben beispielsweise das Entwicklungsstadium, in dem sich die Zellen befinden, oder ein wechselndes Nährstoffangebot. An solche sich ändernde Bedingungen und Zustände müssen die biochemischen Vorgänge in den Zellen angepasst werden, was im Vorfeld zu einer Veränderung der Genexpression führt. Die Untersuchung dieser extrazellulären und intrazellulären Einflüsse auf genetischer Ebene erfordert eine sensitive, präzise und reproduzierbare Messung der spezifischen und manchmal auch nur in sehr geringen Mengen vorhandenen mRNA-Moleküle. Die Methode der Echtzeit-PCR, welche in den Kapiteln 2.3 und 3.8 näher erläutert wird, wird in vielen Bereichen der molekularen Diagnostik und Nukleinsäureanalytik angewendet.

Diese PCR-Technik soll nun auch für Expressionsanalysen für einige Gene von *Aspergillus niger* eingesetzt werden, um die genetische Aktivität der Pilzzellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Ziel ist die Bestimmung der Menge an für das homologe Protein Glucoamylase spezifischen *glaA*-mRNA, welches in dieser Arbeit zur Etablierung einer hierfür geeigneten Methode als Modellprotein diente. Der Verlauf der gebildeten *glaA*-mRNA ist dabei ein Maß für die Genaktivität der Pilzzellen in diesem Fall für das Gen der Glucoamylase, welches unter anderem für die Optimierung des

Kultivierungsprozesses hinsichtlich der Induktion des Promotors PglA sowie der Produktausbeute dienen sollte. Zusätzlich wurden noch andere Gene von *A. niger* hinsichtlich ihrer Eignung als Referenzgene untersucht, welche anschließend der Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten dienen.

Bevor die Quantifizierung von mRNA mittels Echtzeit-PCR routinemäßig erfolgen kann, müssen alle Arbeitsschritte der Probenaufbereitung, wie der Zellaufschluss, die RNA-Isolierung und -Aufreinigung und die Synthese von cDNA durch Reverse Transkription, sowie die Quantifizierung dieser cDNA und die Datenanalyse der Echtzeit-PCR optimiert und standardisiert werden. Um die Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung von mRNA mittels Echtzeit-PCR einschätzen zu können, wurde zusätzlich für jeden einzelnen Arbeitsschritt die relative Standardabweichung bestimmt.

4.1.1 Probenaufbereitung

Eine reproduzierbare und korrekte Quantifizierung von mRNA-Molekülen stellt sehr hohe Anforderungen an die Vorbereitung der Proben. Das wohl größte Problem stellen Ribonukleasen dar, Enzyme, welche ubiquitär vorkommen und Ribonukleinsäuremoleküle abbauen. Verluste der RNA während der Probenvorbereitung würden die Quantifizierung wesentlich beeinflussen. Deshalb ist bei der Probenvorbereitung unbedingt darauf zu achten, dass die RNA-Proben absolut frei von Nukleasen sind. Hinzu kommt, dass außerhalb der Zellen vermehrt Ribonukleasen vorkommen und bei bereits isolierter RNA die Arbeitsweise dementsprechend angepasst werden muss. Aufgrund dessen sollte in jedem Arbeitsschritt der Probenvorbereitung sowie beim Transport und bei der Lagerung der RNA darauf geachtet werden, dass die Proben stets vor dem Abbau durch RNasen geschützt sind [63]. Praktische Maßnahmen hierfür sind ständiges Kühlen der Proben und das Tragen von Handschuhen bei jedem Arbeitsschritt.

Eine weitere wesentliche Voraussetzung für die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von mRNA mittels Echtzeit-PCR ist die optimale und komplette Gewinnung dieser Nukleinsäuren aus der Biomasse.

Zudem sollten die zu quantifizierenden mRNA-Moleküle intakt sein und eine hohe Reinheit aufweisen. Hier würden sich besonders Inhibitoren, welche die enzymkatalysierten Reaktionen wie die reverse Transkription (RT) und die PCR beeinflussen, negativ auf die Quantifizierung der mRNA auswirken [30], [47]. Weiterhin sollte das Umschreiben der in den Proben enthaltenen mRNA in cDNA während der reversen Transkription möglichst vollständig und reproduzierbar erfolgen.

Genomische DNA darf ebenfalls nicht in den RNA-Proben enthalten sein, da diese das Ergebnis der mRNA-Quantifizierung (mittels Echtzeit-PCR) ebenfalls verfälschen würde. Grund dafür ist, dass in der genomischen DNA die gleichen Sequenzabschnitte enthalten sind wie in der mRNA und diese so unbemerkt mitamplifiziert und -quantifiziert werden würden. In dieser Arbeit wurde unter anderem ein Protokoll zur RNA-Probenaufbereitung aus Biopellets von *A. niger* erarbeitet, welches die oben genannten Kriterien erfüllt und im Kapitel 3.5 detailliert beschrieben wurde.

4.1.1.1 Zellaufschluss

Für die Aufreinigung und Gewinnung der Gesamt-RNA aus *A. niger* ist es zunächst notwendig, die Pilzhypen aufzubrechen. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können und die Gleichbehandlung aller zu vergleichenden Proben des Aufschlusses zu gewährleisten, wurde nach einer Methode gesucht, die dieses ermöglicht und zusätzlich die im folgenden aufgeführten Kriterien erfüllt. Der Aufschluss der Biomasse sollte möglichst vollständig erfolgen und der Schutz der RNA vor dem Abbau durch RNasen in jedem Arbeitsgang gewährleistet sein. Da die Pilzhypen von einer festen Zellwand umgeben sind (Kapitel 2.1), muss diese zerstört werden, damit die Zellinhaltsstoffe gewonnen werden können. Nandakumar und Marten [64] zeigten, dass ein mechanischer Zellaufschluss in flüssigem Stickstoff die beste Methode ist, um Zellinhaltsstoffe aus Pilzhypen freizusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Geräte für den Aufschluss des Pilzes

getestet. Dabei kamen eine Mörsermühle (RMI 0, Retsch), eine Kugelschwingmühle (MM 20, Retsch) und ein Steinkugelmörser (Firma Retsch) zum Einsatz. Zunächst wurden die Geräte daraufhin getestet, ob sie die gefrorene Biomasse homogen und möglichst schnell aufschließen. Dazu wurden ca. 60 mg gefriergetrocknete Biomasse in die genannten Geräte zum Aufschluss eingesetzt. Anschließend wurde durch mikroskopische Analyse überprüft, ob die gesamte Biomasse aufgeschlossen war. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch das Mörsern mit der Mörsermühle unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff die Proben komplett und am schnellsten aufgeschlossen werden konnten. Außerdem war während des Mörservorganges das Kühlen der Proben mit flüssigem Stickstoff realisierbar, was bei der Schwingmühle nicht möglich war.

Für die Optimierung des Zellaufschlusses mittels Mörsermühle (Druckeinstellung des Pistills: 1) wurden wiederum ca. 60 mg gefriergetrocknete Biomasse gemörsert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1-15 min) jeweils kleine Mengen des gemörserten Materials entnommen. Die mikroskopische Analyse des entnommenen Materials ergab, dass nach fünf Minuten Mörsern in flüssigem Stickstoff die Biomasse komplett aufgeschlossen war. **Abbildung 4.1 a** stellt gefriergetrocknete Pellets vor dem Mörsern dar. **Abbildung 4.1 b** zeigt eine der Proben, nachdem diese fünf Minuten in flüssigem Stickstoff mittels Mörsermühle aufgeschlossen wurden.

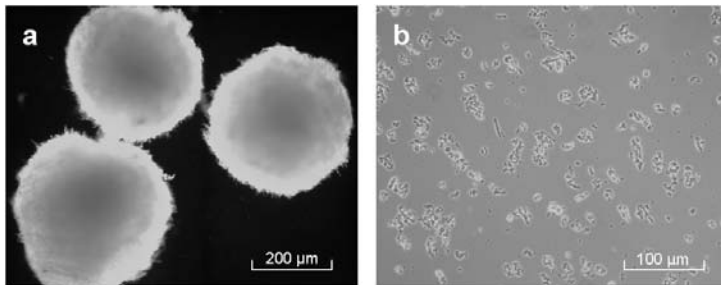


Abbildung 4.1 Mikroskopische Analyse von *A. niger* Biopellets vor und nach dem Mörsern. a) Gefriergetrocknete Pellets von *A. niger*. b) Zellfragmente nach fünf Minuten Mörsern in flüssigem Stickstoff mittels Mörsermühle.

Dieses Beispiel zeigt, dass nach fünfminütigem Mörsern ausschließlich Zellfragmente vorliegen und keine ganzen Pilzhypen mehr vorhanden sind. Aufgrund dessen wurde eine Mörserzeit von fünf Minuten für die zu etablierende Methode festgelegt, um gefriergetrocknete Pilzhypen aufzuschließen [65].

Aufreinigung der Gesamt-RNA

Zur Gewinnung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellextrakten wurde das RNeasy® Plant-Mini-Kit der (Qiagen), siehe Kapitel 3.5.4 verwendet. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde anschließend mit dem Spektrophotometer (NanoDrop®, Kisker) vermessen und dabei sowohl die Konzentration der Proben als auch ihre Reinheit bezüglich noch enthaltener Proteine überprüft. Diesbezügliche Untersuchungen der aufgereinigten RNA-Proben zeigten, dass die gewonnene RNA eine hohe Reinheit besitzt und die RNA-Konzentration der Proben für alle weiteren Schritte zur Quantifizierung ausreichend hoch ist. Da die Unversehrtheit der RNA ebenfalls ein wesentliches Kriterium für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse ist, wurden die RNA-Proben mittels Gelelektrophorese stichprobenartig überprüft.

Die Untersuchungen bezüglich der Reinheit der RNA-Proben ergab, dass die Proben noch genomische DNA enthielten und somit der vom Hersteller vorgeschlagene DNA-Verdau direkt auf der DNA-Adsorptionssäule nicht

ausreichend ist, um genomische DNA restlos aus den Proben zu entfernen. Dies konnte durch Gelelektrophorese festgestellt werden. Alle in der qualitativen und quantitativen PCR verwendeten Primer wurden so ausgewählt, dass sie sowohl an die Sequenz genomischer DNA als auch an die cDNA-Sequenzabfolge binden, wobei die Primer beim Binden an genomischer DNA mindestens ein Intron umspannen. Aus diesem Grund sind die PCR-Amplifikate, welche aus DNA generiert werden, länger (325 bp, spezifische Primer für *glaA*-mRNA) als solche, die aus cDNA entstanden sind (267 bp, spezifische Primer für *glaA*-mRNA). **Abbildung 4.2** zeigt ein Agarosegel nach der Gelelektrophorese.

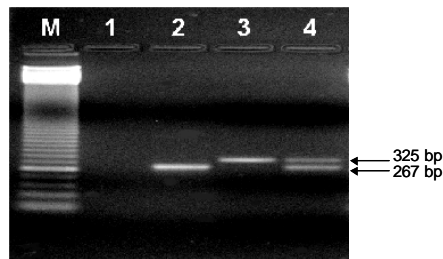


Abbildung 4.2 2.5 % iges Agarosegel nach Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die mittels *glaA*-spezifischer Primer hergestellt wurden; M: Marker (50 bp-Leiter); 1: Kontrolle ohne Template; 2: PCR-Amplifikate aus cDNA (267 bp); 3: PCR-Amplifikate aus genomischer DNA (325 bp), 4: PCR-Amplifikate aus cDNA und genomischer DNA in einem PCR Ansatz.

Aufgetragen wurden PCR-Amplifikate, die aus cDNA (Gelspur 2) und aus genomischer DNA (Gelspur 3) hergestellt wurden, sowie PCR-Amplifikate, welche aus einer DNA-kontaminierten cDNA-Probe generiert wurden (Spur 4). Bei Einsatz der verwendeten LUXTM-Primer in die Echtzeit-PCR ist es bereits nach der Reaktion möglich, anhand einer Schmelzpunktanalyse DNA-Kontaminationen aufzudecken.

Abbildung 4.3 zeigt PCR-Amplifikate, welche mittels Agarose-Gelelektrophorese auf eine DNA-Kontamination überprüft wurden. Aufgetragen wurden PCR-Amplifikate, welche aus unterschiedlichen Proben generiert wurden, für die nach

Herstellerangaben ein DNase-Verdau direkt auf der DNA-Adsorptionssäule durchgeführt wurde.

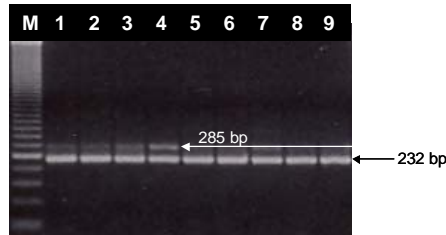


Abbildung 4.3 2,5 % iges Agarosegel nach Gelelektrophorese mit PCR-Produkten (Gelspur 1-9), die mittels 6pfk-spezifischer Primer hergestellt wurden sowie einem Längenmarker (M: 50bp-Leiter).

Zu erkennen ist die erwartete PCR-Produktbande für cDNA bei 232 bp (*6pfk*-spezifische Primer), aber auch bei einigen Proben eine Bande etwas oberhalb bei 285 bp (*6pfk*-spezifische Primer), die deutlich auf eine DNA-Kontamination hinweist. Genomische DNA in den RNA-Proben würde aber das Ergebnis der mRNA-Quantifizierung erheblich verfälschen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Protokoll für einen zweiten DNA-Verdau erarbeitet, der sich direkt an die vom Hersteller vorgeschlagene RNA-Aufreinigung anschließt, allerdings nicht auf der Adsorptionssäule sondern in der Suspension durchgeführt wird (Kapitel 3.5.4). Die Überprüfung der Reinheit dieser Proben erfolgte nach einer qualitativen PCR ebenfalls durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese und zeigte, dass sie frei von genomischer DNA waren.

Der zweite DNA-Verdau stellt somit sicher, dass keine Spuren von DNA mehr in den Proben vorhanden sind. Sollte dennoch eine DNA-Kontamination vorliegen, könnten diese aufgrund der gewählten Primerstrategie mittels Schmelzpunktanalyse oder Agarose-Gelelektrophorese leicht aufgedeckt und die Proben erneut aufgereinigt werden [65].

4.1.2 Reverse Transkription (RT)

Bei diesem Schritt erfolgt das Umschreiben der in den Gesamt-RNA-Proben enthaltenen mRNA in die jeweilige komplementäre DNA (cDNA). Diese Reaktion wird von einer reversen Transkriptase katalysiert, einem Enzym, welches zu den RNA-abhängigen DNA-Polymerasen gehört (siehe dazu auch Kapitel 3.5.5). Die Effizienz der reversen Transkription (RT) ist unter anderem von der Menge der in die Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA abhängig. Eine zu hohe Konzentration kann sich negativ auf die Reaktionseffizienz und somit auf die Menge der aus mRNA synthetisierten cDNA auswirken [66], was zu erheblichen Problemen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, die Reverse Transkription zu vereinheitlichen und alle Proben gleich zu behandeln. Daher wurden alle Proben auf eine Gesamt-RNA-Konzentration von ca. $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ verdünnt. Diese Konzentration lässt sich noch zuverlässig mit dem Spektralphotometer (ND-1000, Firma NanoDrop) quantifizieren, und auch Proben mit geringer RNA-Ausbeute nach der Aufreinigung enthalten noch Gesamt-RNA oberhalb dieser Konzentration. Bei einem Einsatz von $11 \mu\text{L}$ auf $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ verdünnter Gesamt-RNA Probe in die RT ergibt sich pro Ansatz eine RNA-Menge von $0,55 \mu\text{g}$. Diese Menge an RNA liegt in dem vom Hersteller des verwendeten Kit zur Reversen Transkription (SuperScript™ III Reversen Transkriptase, Invitrogen) vorgegebenen Gesamt-RNA Menge von $10 \text{ pg}^{-5} \mu\text{g}$ [65].

4.1.3 Echtzeit-PCR

Für die Echtzeit-PCR in Kapitel 3.8 mit den konstruierten LUX™-Primern wurde ein Protokoll zur Quantifizierung spezifischer mRNA erarbeitet, welches die Konzentrationen der einzelnen Komponenten und das Temperatur-Zeitprogramm für die PCR enthält. Weiterhin wurde für die PCR-Awendung mit LUX™-Primern anhand der Schmelzpunktanalyse die Temperatur bestimmt, bei welcher die online-Datenaufnahme während der Echtzeit-PCR erfolgen sollte. Diese

Temperatur wurde so gewählt, dass selbst im Falle von unerwünschten kurzen Nebenprodukten diese nicht miterfasst werden.

Die Protokolle wurden dahingehend optimiert, dass ausschließlich die gewünschte Zielsequenz mit einer möglichst hohen Effizienz amplifiziert wird und sich keine unspezifischen Produkte sowie sich zusammenlagernde Primer bilden. Die Voraussetzung hierfür ist ein optimales, auf die Primer und Zielsequenz sowie auf die verwendete Taq-Polymerase abgestimmtes PCR-Protokoll Kapitel 3.8.

Hierfür wurden zunächst die MgCl_2 -Konzentration und die Primer-Anlagerungstemperatur für die verwendeten LUX™-Primer (Kapitel 3.6) optimiert. Für diese Untersuchungen wurde ein PCR-Mastermix hergestellt, auf PCR-Gefäße verteilt und die jeweilige MgCl_2 -Menge dazu pipettiert, so dass die Ansätze 3, 4, 5 und 6 mmol L^{-1} MgCl_2 enthielten. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 25 μL . Diese wurden jeweils in der nachfolgenden PCR unterschiedlicher Primer-Anlagerungstemperaturen (Hybridisierung) ausgesetzt (50 °C; 50,9 °C; 52,3 °C; 54,4 °C; 57,5 °C; 59,7 °C, 61,2 °C). Anhand des durch die LUX™-Primer emittierten Fluoreszenzsignals und des daraus über der Zyklenzahl aufgezeichneten Graphen wurde der X_{SDM} -Wert, wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben, ermittelt und für die Auswertung der Daten herangezogen. Zusätzlich wurden die so generierten PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Ausbeute untersucht und auf das Vorhandensein von unspezifischen Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Daten nicht gezeigt). Ein niedriger X_{SDM} -Wert und keine unspezifische Produktbildung bedeutet dabei, dass eine effiziente Vervielfältigung der Zielsequenz stattgefunden hat, was eine optimale Anlagerung der Primer an die Zielsequenz und deren Verlängerung durch die -Polymerase voraussetzt. Den niedrigsten X_{SDM} -Wert erzielten Proben, welche einer Anlagerungstemperatur von 59,7 °C ausgesetzt waren und eine MgCl_2 -Konzentration von 4 mmol L^{-1} und 6 mmol L^{-1} MgCl_2 enthielten. In der Literatur wird ebenfalls eine MgCl_2 -Konzentration von 1-4 mmol L^{-1} vorgeschlagen (Laborjournal online, www.biotech.europe.de).

Aufgrund dieser Ergebnisse und des in der Literatur vorgeschlagenen Konzentrationsbereiches wurden alle weiteren PCR-Ansätze mit den LUXTM-Primern mit einer MgCl₂-Konzentration von 4 mmol L⁻¹ und einer Anlagerungstemperatur von 60 °C durchgeführt.

Die Optimierung der MgCl₂-Konzentration wurde ausschließlich für die *glaA*-LUXTM-Primer durchgeführt. Für die anderen in dieser Arbeit verwendeten LUXTM-Primer wurde lediglich die Funktionsweise bei diesen Parametern überprüft, wobei hier die gleichen Kriterien galten und diese ebenfalls erfüllt wurden.

4.1.4 Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten

Die Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR erfolgt in vielen derzeit zur Verfügung stehenden Geräten standardmäßig durch die Bestimmung des Ct-Wertes. Der Ct-Wert ist dabei definiert als die Anzahl an PCR-Zyklen einer Probe, die erforderlich sind, um einen festgelegten Fluoreszenzschwellenwert, welcher über der Hintergrundfluoreszenz liegt, zu überschreiten. Die Hintergrundfluoreszenz wird wiederum durch die Basislinie, dabei entweder von der Gerätesoftware oder vom Benutzer definiert, beschrieben. Allerdings kann die Festlegung eines gemeinsamen, für alle Proben gleichen Bereiches zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz (beispielsweise vom Zyklus 2-10) zu fehlerbehafteten quantitativen Ergebnissen führen. Die Festlegung eines für alle Proben gemeinsamen Bereiches (Basislinie) ist nur für einen Teil der Proben optimal, wodurch sich für die anderen gegebenenfalls nicht korrekte Ct-Werte ergeben, da diese auch vom Verlauf der Grundfluoreszenz beeinflusst werden [47]. Eine weitere wesentliche Grundlage für eine korrekte Echtzeit-PCR-Auswertung ist, dass der Fluoreszenzschwellenwert in der exponentiellen Phase der Echtzeit-PCR-Kurve diese schneiden muss, da während dieser Phase der PCR noch keine Reaktionslimitierungen auftreten. Das die exponentielle Phase der Echtzeit-PCR-Kurve nicht genau bestimmt werden kann ist ein wesentlicher Nachteil bei dieser Auswertung über den Ct-Wert.

Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung von Echtzeit-PCR-Daten für die quantitative Analyse der DNA oder cDNA beruht auf der Berechnung des X_{SDM} -Wertes, welcher die Wendestelle der ersten Ableitung der sigmoidalen Echtzeit-PCR-Fluoreszenzsignalkurve beschreibt und damit das Ende der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion genau definiert (Kapitel 3.8.4). Der X_{SDM} -Wert ist demzufolge ein charakteristischer Wert dieser Kurve, der wie der Ct-Wert ebenfalls invers mit der eingesetzten Menge an DNA korreliert. Um festzustellen, welche dieser beiden Methoden für die Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten besser geeignet ist, wurde eine Probe 34-fach in die Echtzeit-PCR eingesetzt und jeweils der X_{SDM} -Wert und der Ct-Wert bestimmt. Der Vergleich dieser beiden Auswertemethoden ergab, dass die Auswertung mittels X_{SDM} -Wert eine relative Standardabweichung von 22 % bei Festlegung einer individuellen Basislinie der Mehrfachbestimmung der Probe ergab und 21 %, wenn für alle Proben eine gemeinsame Grundfluoreszenz festgelegt wurde. Im Gegensatz dazu wurde für die gleiche Probe eine höhere relative Standardabweichung von 37 % (bei individueller Basislinie) und 31 % (bei gemeinsamer Basislinie) ermittelt, wenn die Kurven mit der Ct-Wert-Methode ausgewertet wurden.

Die Art und Weise, wie die Grundfluoreszenz bestimmt wird, kann ebenfalls einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Jedoch lagen hier die Werte für die ermittelten relativen Standardabweichungen bei beiden Auswertemethoden (X_{SDM} -Wert oder Ct-Wert) jeweils in ähnlicher Größenordnung.

Die beiden Auswertemethoden wurden zusätzlich für Proben verglichen, die sich hinsichtlich ihrer cDNA-Konzentration unterschieden. Dafür wurden Amplifikate unterschiedlicher DNA-Ausgangskonzentrationen mittels Echtzeit-PCR vervielfältigt, aus den Daten jeweils eine Kalibriergerade erstellt und den Regressionskoeffizienten zur Beurteilung der jeweilige Auswertemethode herangezogen (im Anhang Gleichung 6.3). Hier ergab sich bei der Bestimmung der DNA-Konzentrationen mittels des X_{SDM} -Wertes der höchste Regressionskoeffizient. Dabei wird hier empfohlen, vor allem bei der Quantifizierung von Proben mit hohen DNA-Konzentrationen (X_{SDM} -Wert < 15)

die Basislinie individuell festzulegen, während bei Proben geringer Konzentration die Verwendung einer gemeinsamen Basislinie ausreichend war.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Luu-The et al. [67] die in ihren Arbeiten unter anderem auch diese beiden Auswertemethoden anhand mehrerer Standardkurven bezüglich der Effizienzkoeffizienten und der Steigung miteinander verglichen und ebenfalls feststellten, dass die Methode des Maximums der zweiten Ableitung reproduzierbarere Resultate ergab als die Ct-Wert- Methode [65].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Echtzeit-PCR-Daten mittels der Bestimmung der X_{SDM} -Werte ausgewertet, wobei zuvor die Basislinie individuell festgelegt wurde.

4.1.5 Reproduzierbarkeit der Genexpressionsanalyse

Wie in Kapitel 4.1.1 bereits erwähnt, sollte im Hinblick auf eine reproduzierbare mRNA-Quantifizierung der Aufschluss der Biomasse möglichst homogen und vollständig erfolgen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit sowohl des mechanischen Aufschlusses der Pilzhyphen als auch der Aufreinigung der Gesamt-RNA aus der aufgeschlossenen Biomasse von *A. niger* durchgeführt. Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Echtzeit-PCR und der cDNA-Synthese untersucht.

4.1.5.1 Reproduzierbarkeit der RNA-Gewinnung

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der RNA-Gewinnung wurde zunächst gefriergetrocknete Biomasse für fünf Minuten unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert (Druckeinstellung des Pistills: 1). Aus dem gemörserten Material wurden 15 Proben entnommen und die Gesamt-RNA wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden 30-40 mg des gemörserten Probenmaterials eingesetzt, die genau eingesetzte Masse wurde

mittels einer Feinwaage bestimmt. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Von den 15 Proben wurde anschließend die Gesamt-RNA aufgereinigt, diese mittels Spektrophotometer (siehe Kapitel 3.5.4) quantifiziert und die spezifische Gesamt-RNA-Konzentration pro BTM berechnet. Die Auswertung aller Ergebnisse ergab eine relative Standardabweichung von 44 % für die RNA-Aufreinigung aus aufgeschlossenen Pilzhyphen. Grund für diese relativ hohe Standardabweichung könnten zum einen nicht komplettes Überführen des Lysates zu Beginn der RNA-Aufreinigungsprozedur und zum anderen unvollständiges Homogenisieren des gemörserten Materials mit dem Lysispuffer sein (siehe Kapitel 3.5.4). Zudem können Verluste an Gesamt-RNA während der Aufreinigung einschließlich der Ungenauigkeiten bei der Einwaage und Quantifizierung der Biotrockenmasse Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der Aufreinigung und Bestimmung der Gesamt-RNA aus gemörserter Biomasse verantwortlich sein.

Für die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des mechanischen Aufschlusses inklusive RNA-Aufreinigung von *A. niger* Biomasse wurde Probenmaterial aus einer Kultivierung verwendet. Fünf Proben (30-40 mg) wurden separat für fünf Minuten in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden aus jedem Mörseransatz drei Teilproben entnommen und die RNA wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben aufgereinigt. Die eingesetzte Biomasse wurde auch hier mittels Feinwaage vor dem Mörsern genau bestimmt. Zusätzlich erfolgte die BTM-Bestimmung dieser Proben wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die relative Standardabweichung des mechanischen Aufschlusses der Biomasse inklusive der Gesamt-RNA-Aufreinigung betrug 42 %.

Da die Gesamt-RNA-Aufreinigung mit 44 % eine ähnliche relative Standardabweichung aufweist wie der Aufschluss mit anschließender Gesamt-RNA-Aufreinigung (42 %), kann daraus geschlossen werden, dass die hohe Ungenauigkeit vermutlich durch die Verluste an RNA während der Aufreinigung und Gewinnung der Gesamt-RNA aus der gemörserten Biomasse verursacht wurde, wohingegen der Aufschluss der Pilzzellen reproduzierbar und vollständig

erfolgte. Ausgeschlossen werden kann hier, dass dieser Fehler aus der Bestimmung der Gesamt-RNA mittels Spektrophotometers resultierte. Denn die Reproduzierbarkeit der RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometer (Kapitel 3.5.4) ergab eine relative Standardabweichung von 1,1 %.

4.1.5.2 Reproduzierbarkeit der quantitativen Echtzeit-PCR

Für die Abschätzung der Reproduzierbarkeit der DNA-Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR wurde eine Probe 30-fach hinsichtlich der enthaltenen Menge an *glaA*-mRNA-spezifischer cDNA untersucht. Hierfür wurde ein PCR-Mastermix vorbereitet, der alle Komponenten für die Echtzeit-PCR-Reaktion enthielt bis auf die cDNA, welche für jeden Ansatz separat pipettiert wurde. Für diese Mehrfachbestimmung ergab sich eine relative Standardabweichung der cDNA-Konzentration von 22,1 % (gemeinsame Basislinie). Diese Standardabweichung enthält sowohl die Reproduzierbarkeit des Pipettierens als auch der Messung selbst. Dazu wurde eine solche 30-fach-Bestimmung von verschiedenen Personen durchgeführt, und es wurde jeweils eine relative Standardabweichung in ähnlicher Größenordnung ermittelt.

Für eine 95-fach-Bestimmung, in welcher das Templat zuvor aliquotiert und der Mastermix anschließend hinzugefügt wurde, ergab sich eine relative Standardabweichung der cDNA-Konzentration von 19,3 %. Die Kontrolle der PCR-Amplifikate hinsichtlich enthaltenen unspezifischer Produkte, Primerdimere oder genomischer DNA zeigte, dass das Amplifikat rein war und hier ausschließlich die ausgewählte Sequenz vervielfältigt wurde. Dennoch ist die relative Standardabweichung der Echtzeit-PCR-Daten relativ hoch, wobei nicht festzustellen ist, ob diese auf die Messung selbst oder die Auswertung zurückzuführen ist. Stahlberg et al. [66] führten ebenfalls Versuche hinsichtlich der Variation der cDNA Konzentrationsbestimmung mittels Echtzeit-PCR nach reverser Transkription durch. Hier ergaben sich beispielsweise bei einer 5-fach-Bestimmung eine Variation der cDNA Konzentration von 26 %.

4.1.5.3 Reproduzierbarkeit der reversen Transkription

Für die reverse Transkription (RT) wurde das Kit SuperScript™ III (Invitrogen), oligo (dT)₂₀ Primer und RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen) eingesetzt und ein mittlerer Konzentrationsbereich der Gesamt-RNA von 0,5 µg µL⁻¹ bzw. 1 µg µL⁻¹ pro Reaktionsansatz hinsichtlich der Reproduzierbarkeit überprüft. Hierfür wurden die Proben jeweils auf die genannte Gesamt-RNA-Konzentration von 0,5 µg µL⁻¹ bzw. 1,0 µg µL⁻¹ verdünnt und 15-fach jeweils 1 µL der entsprechenden Lösung in die Reaktion gebracht (Kapitel 3.5.5). Im Anschluss daran wurden je 2 µL der RT-Ansätze in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Über die ermittelten X_{SDM}-Werte ergab sich für die RT mit anschließender Echtzeit-PCR eine mittlere Standardabweichung der X_{SDM}-Werte von 16 %, was einer Standardabweichung der cDNA-Konzentration von 20,4 % bei einer Reaktionseffizienz von 100% entspricht (Berechnung nach Stahlberg et al. [66]). Bei den Proben mit 1 µg µL⁻¹ Gesamt-RNA wurde eine relative Standardabweichung der X_{SDM}-Werte von 20 % ermittelt, was einer Standardabweichung der cDNA-Konzentration von 22 % entspricht. Die ermittelten relativen Standardabweichungen der reversen Transkription mit anschließender PCR liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie für die PCR-Reaktion allein, so dass davon ausgegangen wird, dass der hier überprüfte Konzentrationsbereich von 0,5-1 µg µL⁻¹ Gesamt-RNA für die reverse Transkription mit dem oben genannten Kit reproduzierbare Ergebnisse liefert. Demzufolge wurde in allen durchgeführten RT-Reaktionen eine Gesamt-RNA-Konzentration von ca. 0,55 µg µL⁻¹ pro Ansatz eingesetzt.

4.2 Bezugssysteme zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten

Die Betrachtung der einzelnen Arbeitsschritte zur Quantifizierung von mRNA sowie der verwendeten analytischen Messmethoden hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit hat gezeigt, dass gerade die Aufarbeitungsschritte zur

Gewinnung von RNA durch eine große Variation der erzielten Ergebnisse gekennzeichnet sind, was darauf hindeutet, dass es während der RNA-Aufreinigung vermutlich zu Verlusten an RNA kommt. Hinzu kommen eventuell auftretende Effizienzunterschiede während der reversen Transkription, welche die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung von mRNA mittels Echtzeit-PCR stark beeinflussen können. Um diese Unterschiede zwischen den Proben bei der quantitativen Analyse von mRNA auszugleichen, ist es notwendig, die ermittelten Echtzeit-PCR-Daten der spezifischen mRNA durch Bezug auf ein Referenzsystem zu normalisieren. Für diesen Zweck stehen verschiedene Bezugssysteme zur Verfügung, die in Kapitel 2.4 bereits beschrieben wurden.

4.2.1.1 Gesamt-RNA-Konzentration

Ein solches Bezugssystem stellt beispielsweise die Gesamt-RNA dar. Hier wird die ermittelte mRNA-Konzentration auf die Gesamt-RNA-Konzentration bezogen, welche vor jeder reversen Transkription routinemäßig bestimmt wird, so dass bei Verwendung dieses Referenzsystems die Ungenauigkeiten und Verluste an RNA, die während der Probenaufbereitung auftreten, korrigiert werden. Dieses Referenzsystem weist allerdings einige Nachteile auf [36], wie zum Beispiel, dass mögliche Effizienzunterschiede, die während der reversen Transkription auftreten können, nicht berücksichtigt werden und dass dieses Bezugssystem nicht eingesetzt werden kann, wenn die Probe nur eine sehr geringe RNA-Konzentration enthält. Eines der wesentlichsten Argumente gegen die Verwendung dieses Bezugssystems ist, dass die Gesamt-RNA hauptsächlich aus rRNA besteht und die mRNA nur zu einem sehr geringen Anteil in der RNA-Gesamtmenge vertreten ist. Weiterhin kann die Gesamt-RNA-Konzentration zwischen verschiedenen Geweben und Individuen sowie in unterschiedlichen Stadien der Zellen schwanken, worüber allerdings noch sehr wenig bekannt ist. Dennoch wird die Gesamt-RNA als Bezugssystem vorgeschlagen [36]. Ein wesentlicher Vorteil hier ist der relativ geringe Zeitaufwand bei der Bestimmung der Gesamt-RNA als Referenz. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist allerdings die korrekte Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA.

Um festzustellen, welchen Konzentrationsschwankungen und Änderungen die Gesamt-RNA von *A. niger* während der Kultivierung unterliegt, wurde beispielhaft die Gesamt-RNA-Konzentration der Kultivierung 1 bestimmt. Dabei wurden die Proben wie in Kapitel 3.5.1, 3.5.4 und 3.9 beschrieben behandelt. Die Probennahmen erfolgten nach 50 Stunden der Kultivierung, da vor diesem Zeitpunkt zu wenig Biomasse für die RNA-Gewinnung und BTM-Bestimmung vorhanden war.

Die Resultate dieser Untersuchung zeigen, dass sich die Gesamt-RNA-Konzentration pro Biotrockenmasse zwischen 50 Stunden und 56 Stunden der Kultivierungszeit stark und im weiteren Verlauf der Kultivierung weniger stark verringerte (siehe

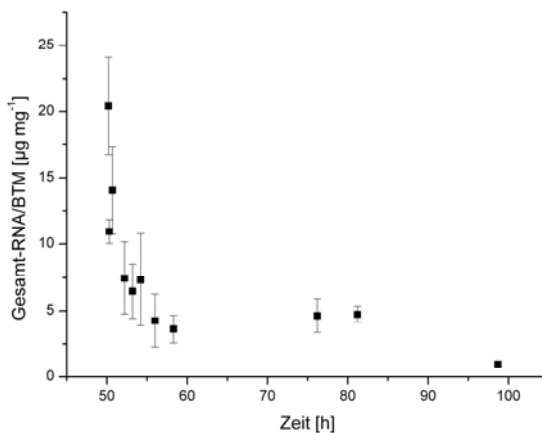


Abbildung 4.4). Allerdings ist hier zu beachten, dass der Pilz in Pelletform gewachsen ist. Das führt dazu, dass das Innere der Pilzpellets ab einer bestimmten Größe und Dichte substratlimitiert ist und demzufolge die Zellen im Inneren auf genetischer Ebene weniger aktiv sind als die Zellen, welche sich in den äußeren Schichten eines solchen Pellets befinden, so dass es hier zu einer erheblichen Fehleinschätzung der Gesamt-RNA-Konzentration pro Biotrockenmasse kommt. Außerdem ist der Fehler bei der Gesamt-RNA-Aufreinigung und BTM-

Bestimmung relativ hoch (Kapitel 4.1.5.1), was ebenfalls zu einer Verfälschung dieser Ergebnisse führen kann. Somit kann über die Veränderung der Gesamt-RNA während einer Kultivierung von *A. niger* keine eindeutige Aussage getroffen und die Eignung als Bezugssystem so nicht festgestellt werden.

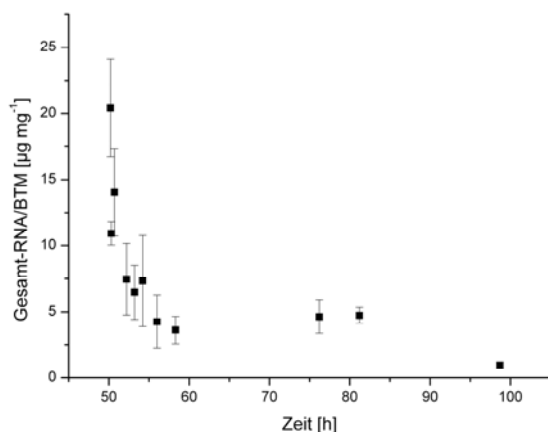


Abbildung 4.4 Verlauf der Gesamt-RNA Konzentration von *A. niger* aus Proben der Kultivierung 1 (Batch-Kultivierung, Induktion der Glucoamylasesynthese nach 50 Stunden mit Maltose).

4.2.1.2 Referenzgene

Das derzeit am häufigsten verwendete Bezugssystem zur Normalisierung von Genexpressionsdaten sind Gene, welche unter verschiedenen experimentellen Bedingungen einen stabilen Expressionslevel aufweisen. Solche Gene werden oft in der Fraktion der so genannten Housekeeping-Gene gefunden, welche für Proteine kodieren, die am Erhaltungsstoffwechsel der Zelle beteiligt sind, weshalb sie relativ stabil exprimiert werden sollten. Oftmals werden zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten zwar klassische Housekeeping-Gene wie beispielsweise β -Actin, ein Protein des Cytoskeletts, oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse, als Referenzgene eingesetzt [51], [52]. Doch immer häufiger wird deren Eignung dafür in Frage gestellt [36], [54], [55], [56]. Die Literatur zeigt, dass bis heute noch kein ideales Referenzgen

gefunden wurde, welches unabhängig von äußeren Einflüssen auf Zellen und vom jeweiligen Organismus oder Gewebe einen stabilen Expressionslevel aufweist [36], [44], [56], [68], [69]. Zur Bestimmung geeigneter Referenzgene ist es notwendig, für jeden Organismus und für jede Variation der experimentellen Bedingungen geeignete Gene zu finden, welche konstant exprimiert werden, deren mRNA-Menge also keine nennenswerten Schwankungen aufweist, unabhängig davon, in welchem Zustand sich die Zellen gerade befinden. Weiterhin muss für jede neue Variation der experimentellen Bedingung kontrolliert werden, ob die Referenzgene weiterhin noch eine konstante Expression aufweisen. Zusätzlich wird vorgeschlagen, nicht nur die Expressionsdaten von einem Gen zur Normalisierung zu verwenden, sondern mindestens drei Gene dafür heranzuziehen, um eventuell auftretende unerwartete Expressionsschwankungen eines Gens ausgleichen zu können [1].

Aus diesem Grund wurden zur Normalisierung von Genexpressionsdaten in *A. niger* mehrere Gene dieses Pilzes hinsichtlich ihres Expressionslevels bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht und ihre Eignung als Bezugssystem zur Normalisierung quantitativer Echtzeit-PCR-Daten überprüft.

Vandesompele et al. [1] beschreiben einen Lösungsansatz zur Bestimmung solcher Referenzgene (Kapitel 2.4). Der Grundgedanke dabei ist, dass das Verhältnis zweier idealer Referenzgene und damit der Quotient ihrer Expressionslevel in allen Proben gleich ist, unabhängig von den experimentellen Bedingungen. Wenn der Quotient variiert, bedeutet dies, dass mindestens eines der beiden untersuchten Gene nicht stabil exprimiert wird. Dabei bedeutet eine Zunahme der Variation des Expressionsverhältnisses eine Abnahme der Expressionsstabilität. Gesucht wird deshalb nach einer Kombination zweier Gene, die eine möglichst geringe Variation der Quotienten der jeweiligen Expressionslevel aufweist.

Um die Genkombinationen mit den geringsten Variationen zu finden, wurde die Datenverarbeitung zur Auswahl geeigneter Referenzgene (Kapitel 3.8.4), in

Anlehnung an die Vorgehensweise von Vandesompele et al. [1] durchgeführt. Hierzu wurden die X_{SDM} -Werte der jeweiligen Gene bestimmt und diese für die statistische Auswertung herangezogen (Kapitel 3.12).

Für die Suche nach solchen Referenzgenen zur Normalisierung von Genexpressionsdaten von *A. niger* wurden zunächst 10 Gene ausgesucht, die am Erhaltungsstoffwechsel des Pilzes beteiligt sind. Die Sequenzen wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben ermittelt, ein Primerpaar für jedes dieser Gene wie in Kapitel 3.7 aufgeführt konstruiert und eine Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR durchgeführt (Kapitel 3.8). Als Detektionssystem wurde die LUXTM-Primer-Technologie verwendet, welche in Kapitel 2.3 näher erläutert wird. Es wurden Proben aus unterschiedlichen Kultivierungen untersucht (siehe Kapitel 3.3).

Für die Überprüfung der in **Tabelle 3.6** aufgelisteten Housekeeping-Gene auf ihre Eignung als Referenzgen, wurde wie in Kapitel 3.12 beschrieben vorgegangen. Zunächst wurden neun Proben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung 4 genommen wurden, untersucht (Fedbatch auf Glucose). Anhand der ermittelten Daten konnte festgestellt werden, dass die X_{SDM} -Werte über die gesamte Kultivierungszeit variieren Abbildung 4.5. Dies kann einerseits an der Expressionsschwankung der betrachteten Gene liegen, wie sie für Housekeeping-Gene bereits in der Literatur beschrieben wurde [54], [53], [70], [56], [71]. Andererseits wurden hier die Proben wie in Kapitel 3.9 beschrieben auf eine ähnliche Gesamt-RNA-Konzentration für die reverse Transkription eingestellt. Dies kann möglicherweise mit für die Schwankungen der Expressionslevel verantwortlich sein. Weiterhin könnten auch unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription die Ergebnisse aus der Quantifizierung beeinflusst haben.

Nach Auswertung dieses Datensatzes ist jedoch zu erkennen, dass sich die X_{SDM} -Werte einiger Gene ähnlich zueinander verhalten. Dies gilt sowohl für die Gene *act* und *cox5* als auch für *sarA*, *apsC* und *gspd*. Hier treten jeweils ähnliche X_{SDM} -Wert-Schwankungen zwischen den Proben auf. Wird beispielsweise das Gen *sarA* im Vergleich zu einigen anderen Genen betrachtet (vergl. Abbildung 4.5) kann festgestellt werden, dass der jeweilige Quotient ihrer Expressionslevel

unterschiedlich stark schwankt. Je höher diese Schwankung ausfällt, umso mehr schwankt der Expressionslevel mindestens eines der beiden jeweils betrachteten Gene. Das oft als Bezugssystem verwendete Gen *gapdh* [51], [52] weist diesbezüglich besonders hohe Schwankungen auf, was auch für das Verhältnis seines Expressionslevels zu den anderen betrachteten Housekeeping-Genen beobachtet werden kann und was bereits darauf hindeutet, dass dieses Gen als Referenzgen eher ungeeignet ist.

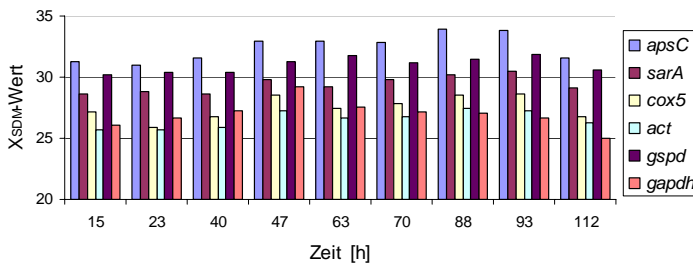


Abbildung 4.5 X_{SDM} -Werte ausgewählter Gene (*apsC*, *sarA*, *cox5*, *act*, *gspd*, *gapdh*) mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung 4.

Die erste Untersuchung von Expressionen verschiedener Gene zeigte, dass einige Gene ein relativ konstantes Verhältnis der Transkriptmengen aufweisen, was ein Indiz dafür ist, dass es sich hierbei um mögliche Kandidaten für Referenzgene handelt. Zur Bestimmung der Genkombinationen mit den geringsten Variationen wurde wie in Kapitel 3.12 beschrieben vorgegangen. Nach der Bestimmung der X_{SDM} -Werte erfolgte die statistische Auswertung dieser Daten. Als erstes wurde die Menge A_{jk} wie in Kapitel 3.12 beschriebene ermittelt und anschließend die Standardabweichung nach Gleichung 2.2 bestimmt. Die somit erhaltenen Werte wurden zur Berechnung des Genstabilitätsmaß M für das jeweilige Gen (Gleichung 2.3) verwendet. Dabei weisen Gene mit einem hohen M -Wert die geringste Expressionsstabilität auf. Nach Ausschluss des Gens mit dem höchsten M -Wert wurde die Expressionsstabilität der noch verbliebenen Gene über die Berechnung des M -Wertes erneut ermittelt und wiederum das instabilste Gen ausgeschlossen. Diese Prozedur wurde mehrfach jeweils unter Ausschluss des Gens mit dem

höchsten M-Wert wiederholt. In **Tabelle 4.1** sind die ermittelten M-Werte für alle Gene aufgelistet, wobei mit dem Gen mit dem niedrigsten M-Wert begonnen wird.

Tabelle 4.1 Genstabilitätsmaß M für 10 Gene ermittelt aus 9 Proben der Kultivierung 4

Reihen- folge	Gen	M-Wert n=10	Gen	M-Wert n=9	Gen	M-Wert n=8	Gen	M-Wert n=7	Gen	M-Wert n=6
1	<i>act</i>	0,5309	<i>act</i>	0,4773	<i>act</i>	0,4397	<i>act</i>	0,4037	<i>act</i>	0,3659
2	<i>gspd</i>	0,5918	<i>sarA</i>	0,5429	<i>gspd</i>	0,4978	<i>sarA</i>	0,4659	<i>sarA</i>	0,4287
3	<i>sarA</i>	0,6030	<i>gspd</i>	0,5439	<i>sarA</i>	0,5077	<i>gspd</i>	0,4798	<i>gspd</i>	0,4289
4	<i>pgiA</i>	0,6041	<i>cox5</i>	0,5672	<i>cox5</i>	0,5342	<i>cox5</i>	0,4820	<i>cox5</i>	0,4835
5	<i>cox5</i>	0,6171	<i>pgiA</i>	0,5890	<i>pgiA</i>	0,5580	<i>apsC</i>	0,5585	<i>apsC</i>	0,5051
6	<i>glkA</i>	0,7230	<i>apsC</i>	0,6739	<i>apsC</i>	0,6212	<i>pgiA</i>	0,5612	<i>pgiA</i>	0,5184
7	<i>apsC</i>	0,7255	<i>icdA</i>	0,6866	<i>icdA</i>	0,6785	<i>icdA</i>	0,6756	-	-
8	<i>icdA</i>	0,7260	<i>glkA</i>	0,7238	<i>glkA</i>	0,7287	-	-	-	-
9	<i>pfkA</i>	0,8095	<i>pfkA</i>	0,8096	-	-	-	-	-	-
10	<i>gapdh</i>	0,9404	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhand der in Tabelle 4.1 aufgelisteten Gene sowie der ermittelten M-Werte ist erkennbar, dass *act*, *sarA*, *gspd*, *cox5*, *apsC* und *pgiA* am stabilsten exprimiert werden. Deutlich ist auch hier ebenfalls, dass sich für *gapdh*, ein Gen, welches häufig zur Normalisierung von Echtzeit-PCR Daten herangezogen wird [72], [51], [52], das höchste Genstabilitätsmaß ergab. Hier zeigten bereits andere Studien, dass dieses Gen einer starken Regulation unterliegt und somit als Referenzgen nicht geeignet ist [42], [36]. Weiterhin machen die ermittelten M-Werte in Tabelle 4.1 deutlich, dass sich die Genstabilitätsmaße bei Einbeziehung von 10 Genen, aber auch bei Verwendung von 9, 8 und 7 Genen, deutlich unterscheiden, während sich bei Einbeziehung von 6 Genen die M-Werte sehr ähneln. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die 6 stabilsten Gene (*act*, *sarA*, *gspd*, *cox5*, *apsC*, *pgiA*) für weitere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Stabilität herangezogen.

Für weitere Untersuchungen wurden nicht nur Proben, welche aus einer einzigen Kultivierung zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten stammten, sondern

auch Proben aus mehreren Kultivierungen, die sich hinsichtlich der experimentellen Bedingungen unterschieden, untersucht. Hierbei handelte es sich um insgesamt 41 Proben aus 5 verschiedenen Kultivierungen (1-5, siehe Kapitel 3.3). Um die Proben direkt miteinander vergleichen zu können und um eventuell auftretende Effizienzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Läufen auszuschließen, wurden alle Proben in einem Echtzeit-PCR-Lauf vermessen, wobei zusätzlich eine Doppelbestimmung für jede dieser Proben erfolgte. Die Datenermittlung wurde wie oben bereits für die Kultivierung 4 beschrieben durchgeführt. Auch hier zeigte sich wie bei der Kultivierung 4, dass die X_{SDM} -Werte zwar wiederum schwanken, sich aber die Differenz der für die jeweiligen Gene ermittelten X_{SDM} -Werte und damit das Verhältnis ihrer Expressionslevel sehr ähnlich verhalten.

Aus den ermittelten X_{SDM} -Werten wurden erneut die Expressionsstabilitäten M bestimmt, welche in **Tabelle 4.2** dargestellt sind. Aus der Reihenfolge des schrittweisen Ausschlusses des jeweiligen am wenigsten stabil exprimierten Gens ergab sich die in Tabelle 4.2 gezeigte Reihenfolge der 6 Gene hinsichtlich ihrer Genexpressionsstabilität. Am stabilsten von diesen Genen für *A. niger* unter den betrachteten Kultivierungsbedingungen erwiesen sich die Gene *act* und *sarA* sowie *cox5*.

Tabelle 4.2 Genstabilitätsmaße M von 6 Genen in 41 Proben der Kultivierungen 1-5

Reihenfolge	Gen	M-Wert n=6	Gen	M-Wert n=5	Gen	M-Wert n=4	Gen	M-Wert n=3
1	<i>sarA</i>	0,8589	<i>sarA</i>	0,8002	<i>sarA</i>	0,7158	<i>sarA</i>	0,5789
2	<i>act</i>	0,9145	<i>act</i>	0,8388	<i>act</i>	0,7297	<i>act</i>	0,6745
3	<i>cox5</i>	1,1077	<i>cox5</i>	1,0388	<i>cox5</i>	0,9513	<i>cox5</i>	0,8034
4	<i>pgiA</i>	1,1705	<i>pgiA</i>	1,0453	<i>pgiA</i>	1,0257	-	-
5	<i>apsC</i>	1,2381	<i>apsC</i>	1,1561	-	-	-	-
6	<i>gspd</i>	1,3864	-	-	-	-	-	-

Für die Untersuchungen zur Auswahl geeigneter Referenzgene wurden bisher nur Kultivierungen betrachtet, bei welcher die Glucoamylasesynthese induziert wurde. Interessant wäre aber auch zu wissen, wie sich die Expressionslevel der analysierten stabil exprimierten Gene von *A. niger* verhalten, wenn die Glucoamylasesynthese nicht induziert wird. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Glucoamylase-Expression und dem Expressionsverhalten der ermittelten Referenzgene.

Dazu wurde eine Kultivierung (6) durchgeführt, in welcher ausschließlich Xylose als Substrat diente (siehe Kultivierung 6, Kapitel 3.3). Xylose ist ein Zucker, welcher nicht induzierend auf das *glaA*-Genexpressionssystem wirkt [73].

Aus dieser Kultivierung wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und wie in 3.4 beschrieben weiterverarbeitet. Dabei wurde wie bei den bereits untersuchten Proben der Kultivierung 1-5 vorgegangen. Zusätzlich zu den 10 Proben der Kultivierung 6 (Xylose ohne Glucoamylaseinduktion) wurden 9 Proben aus den Kultivierungen 1-5 zusätzlich mit einbezogen.

Auch bei Einbeziehung der Proben einer weiteren Kultivierung, bei welcher keine Induktion der Glucoamylasesynthese stattfand, zeigen die Genstabilitätsmaße, dass ebenfalls die Gene *act*, *cox5* und *sarA* am stabilsten exprimiert werden.

Zusätzlich wurden alle in dieser Arbeit ermittelten M-Werte mit dem von Vandesompele et al. [1] im Internet, verfügbaren Programm (genNorm) zur Ermittlung von Referenzgenen überprüft (Kapitel 3.12). Dabei ergaben sich die gleichen Werte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die in dieser Arbeit dargestellte Vorgehensweise zur Feststellung von Referenzgenen zu gleichen Ergebnissen führt wie die von Vandessompele et al. [1] vorgeschlagene Herangehensweise.

Aufgrund der hier erbrachten Resultate werden die Gene *sarA*, *act* und *cox5* als Referenzgene für Genexpressionsstudien in *Aspergillus niger* unter den untersuchten Bedingungen vorgeschlagen.

4.2.1.3 Vergleich der Bezugssysteme

Um festzustellen, welches Bezugssystem zur Quantifizierung spezifischer mRNA von *A. niger* am besten geeignet ist, wurden Proben unterschiedlicher Kultivierungen hinsichtlich der für das Protein Glucoamylase spezifischen mRNA (*glaA*-mRNA) mittels Echtzeit-PCR quantifiziert und miteinander verglichen. Die Kultivierungen unterschieden sich hinsichtlich der C-Quelle, der Kultivierungsart (Batch, Fedbatch) sowie durch die verwendete Induktionstrategie. Die Proben stammten aus den in Kapitel 3.3 beschriebenen Kultivierungen 1, 3 und 6. Die Aufarbeitung sowie die quantitative Bestimmung der *glaA*-mRNA erfolgten wie in Kapitel 3.5 und Kapitel 3.8 beschrieben. Die anhand der Echtzeit-PCR generierten Daten wurden mit der Konzentration von Referenzgenen (Kapitel 3.8.5 und Kapitel 2.5) sowie mittels der Gesamt-RNA-Konzentration (Kapitel 3.9) normalisiert und die so erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Sowohl für die Standards als auch für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der PCR wurden die PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse und zusätzlicher Agarose-Gelelektrophorese auf DNA-Kontaminationen, Primerdimere und unspezifische Produktbildung untersucht und festgestellt, dass bei allen untersuchten Proben ausschließlich die gewünschte cDNA-Sequenz amplifiziert wurde. Weitere Messgrößen, wie die Biotrockenmassekonzentration (Kapitel 3.4.1) und die Konzentration der Induktoren Maltose und Glucose (Kapi-

tel 3.4.3) wurden ebenfalls betrachtet, da diese im direkten Zusammenhang mit der Bildung der für die Glucoamylase spezifischen mRNA stehen [16].

Die folgende Abbildung 4.6, **Abbildung 4.7** und **Abbildung 4.8** zeigen die relativen Transkriptmengen der *glaA*-mRNA über der Kultivierungszeit, welche zum einen auf die Gesamt-RNA-Konzentration und zum anderen auf die Kopienanzahl der Referenzgene bezogen wurden. Zusätzlich ist der zeitliche Verlauf der Biotrockenmassekonzentration für die entsprechenden Kultivierungen dargestellt.

Die Abbildung 4.6 zeigt deutlich, dass sich zwischen 50 und 58 Stunden der Kultivierung 1 (Batch-Kultivierung, Induktion nach 50 Stunden durch Maltosepuls, siehe Kapitel 3.3) ein ähnlicher Verlauf der relativen *glaA*-mRNA-Mengen bei Verwendung der beiden genannten Bezugssysteme ergibt.

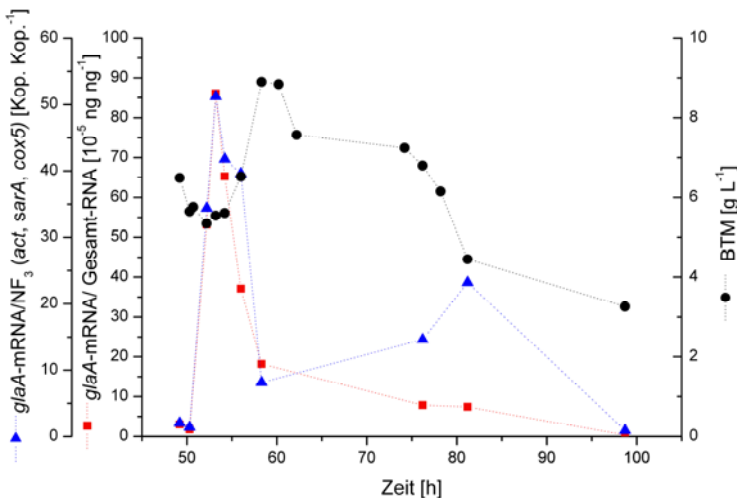


Abbildung 4.6 Verlauf der sowohl mit den Referenzgenen NF₃(*act*, *sarA*, *cox5*) als auch mittels Gesamt-RNA normalisierten *glaA*-mRNA-Mengen und der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration der Batch-Kultivierung 1 (Induktion nach 50 Stunden durch Maltose).

Dabei steigt die relative Transkriptmenge zunächst innerhalb von 2 Stunden nach Induktion stark an und sinkt dann anschließend wieder stark ab. Im weiteren Kultivierungsverlauf zeigt sich, dass bei der Verwendung von Gesamt-RNA als Bezugssystem nach 58 Stunden eine weitere, etwas geringere Abnahme der relativen mRNA-Menge erfolgte. Im Vergleich dazu ist bei Verwendung der Referenzgene als Bezugssystem nach 58 Stunden ein erneuter geringer Anstieg der relativen Transkriptmengen zu verzeichnen. Dieser Verlauf setzt sich fort, bis auch hier nach ca. 80 Stunden die relative mRNA-Menge bezogen auf die Referenzgene NF₃(*act*, *sarA*, *cox5*) absinkt und nach ca. 90 Stunden den Wert bei Bezug auf die Gesamt-RNA wieder erreicht.

Die Ergebnisse aus der Kultivierung 3, dargestellt in Abbildung 4.7 (Fedbatch-Kultivierung, Induktion durch Glucose bereits zu Beginn der Kultivierung, siehe Kapitel 3.3), zeigen, dass auch hier die relativen *glaA*-mRNA-Mengen bei Verwendung der beiden Bezugssysteme wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, ähnlich verlaufen.

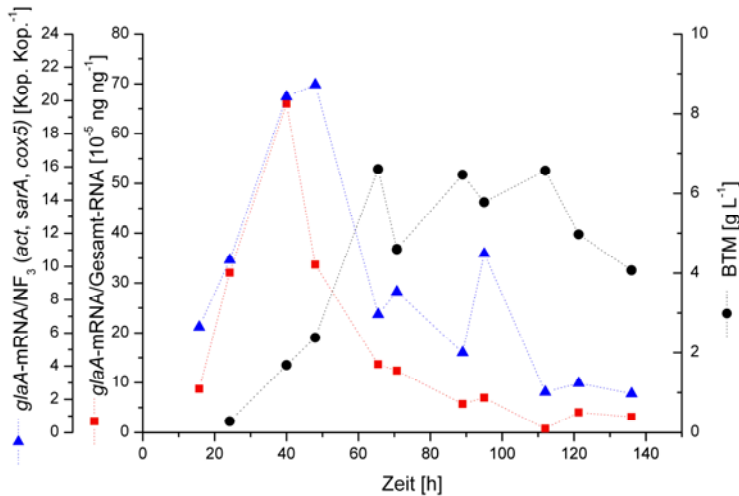


Abbildung 4.7 Verlauf der sowohl mit den Referenzgenen NF_3 (*act*, *sarA*, *cox5*) als auch auf die Gesamt-RNA normalisierten *glA*-mRNA-Mengen und die Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration der Fedbatch-Kultivierung 3 (Induktion durch Glucose bereits zu Beginn der Kultivierung).

Die Ergebnisse einer weiteren Kultivierung 6 (Batch-Kultivierung, ohne Induktion, siehe Kapitel 3.3.) sind in **Abbildung 4.8** dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Kurvenverläufe der relativen mRNA-Mengen weniger als bei den bisher betrachteten Kultivierungen übereinstimmen. Hier konnte nur ein gemeinsamer Trend der Kurvenverläufe der relativen Transkriptmengen verzeichnet werden. Bis zum Zeitpunkt von etwa 53 Stunden nimmt die relative Transkriptmenge beim Gebrauch beider Bezugssysteme ab. Dabei ist der Abfall der relativen Transkriptmengen nach ca. 28 Stunden dieser Kultivierung steiler, wenn diese auf Gesamt-RNA-Menge bezogen wurden als bei Verwendung der Referenzgene als Bezugssystem. Anschließend steigt die relative *glA*-Kopienzahl bei Verwendung der Referenzgene bis zum Ende der Kultivierung stetig an. Bei Nutzung der Gesamt-RNA als Referenz ist dieser Anstieg ebenfalls zu beobachten, allerdings etwas steiler und nur bis ca. 70 Stunden der Kultivierung.

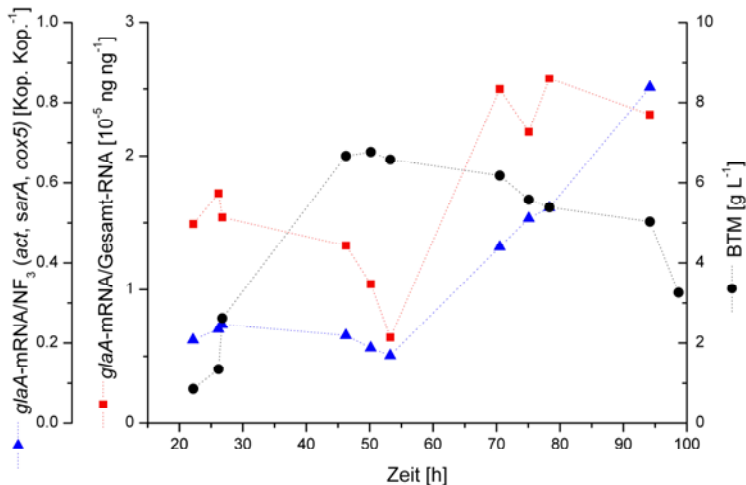


Abbildung 4.8 Verlauf der sowohl mit de Referenzgenen $\text{NF}_3(\text{act, sarA, cox5})$ als auch auf die Gesamt-RNA normalisierten *glaA*-mRNA-Mengen und die Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration der Batch-Kultivierung 6 (ohne Induktion).

Der Vergleich der untersuchten Kultivierungen 1 und 3 verdeutlichen, dass sich die beiden betrachteten Bezugssysteme innerhalb der Hauptbildungsphase der *glaA*-mRNA zwischen 50 und 60 Stunden (Kultivierung 1) bzw. 20 und 70 Stunden (Kultivierung 3) bezüglich des Expressionsergebnisses nicht wesentlich unterscheiden und somit gleiche Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Transkriptmengen getroffen werden können. Nach Beendigung der Transkriptbildungsphase treten allerdings erhebliche Unterschiede in den Resultaten auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier der Pilz bereits wachstumslimitierenden Bedingungen ausgesetzt ist und es zur Lyse der Pilzzellen kommt, was anhand der Biotrockenmasseentwicklung beobachtet werden kann. Der Verlauf der Gesamt-

RNA pro Biotrockenmasse bei Pilzpellets wurde bereits in

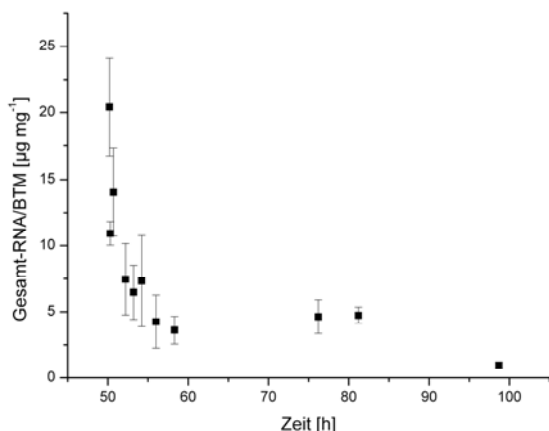


Abbildung 4.4 für eine Kultivierung dargestellt und zeigt, dass die Gesamt-RNA-Menge pro Biotrockenmasse über der Zeit deutlich abnimmt. Grund hierfür ist vermutlich der Abbau der Gesamt-RNA und die Verringerung der allgemeinen genetischen Aktivität des Pilzes, was beispielsweise durch Substratlimitierung vor allem im Pelletinneren während der Kultivierung von *A. niger* verursacht wird [74]. Dies würde auch den weniger steilen Abfall der relativen mRNA-Menge bezogen auf die Gesamt-RNA-Menge nach 58 Stunden der Kultivierung 1 (Abbildung 4.9) bzw. 45 Stunden der Kultivierung 3 (Abbildung 4.10) erklären, wenn davon ausgegangen wird, dass die für die Glucoamylase spezifische mRNA weniger stark abgebaut wird als die durchschnittliche Gesamt-RNA aller RNA-Moleküle.

Der Anstieg der *glaA*-mRNA-Menge bezogen auf die Referenzgene $\text{NF}_3(\text{act}, \text{sarA}, \text{cox5})$ zwischen 60 und 80 Stunden der Kultivierung 1 bzw. 65 und 100 Stunden der Kultivierung 3, kann ebenfalls dadurch begründet sein, dass die *glaA*-mRNA weniger schnell abgebaut wird als die RNA der drei Referenzgene. Im Falle der Glucoamylase könnte eine größere Stabilität vermutet werden, da dieses Enzym mit der Bereitstellung von Glucoseeinheiten aus Stärke und

Maltose eine wichtige Stoffwechselfunktion hat, was eine längere Halbwertszeit der für das Protein kodierenden mRNA zur Folge hat. Das gleiche gilt für die Kultivierung 6. Der Anstieg der relativen Transkriptmengen nach 53 Stunden der Kultivierung bei beiden Referenzsystemen lässt sich hier ebenfalls damit begründen, dass hier vermutlich die Gesamt-RNA und die mRNA der Referenzgene zwischen 53 und 95 Stunden der Kultivierung im Verhältnis zur *glaA*-mRNA schneller abgebaut wurden, was dazu führt, dass der Quotient (relativ) aus *glaA*-mRNA und Bezugssystem zunimmt.

Die Verwendung von Gesamt-RNA als Bezugssystem für quantitative Echtzeit-PCR-Daten ist aufgrund des relativ geringen Aufwandes gegenüber der Verwendung von Referenzgenen in manchen Fällen zu bevorzugen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass bei Verwendung von Gesamt-RNA als Bezugssystem der Trend des zeitlichen Verlaufes der relativen Transkriptmengen abgeschätzt werden kann, was allerdings eine exakte Quantifizierung der Gesamt-RNA-Konzentration voraussetzt. Die Quantifizierung von Nukleinsäuremolekülen, welche auf der Lichtabsorption bei 260 nm basiert und in dieser Arbeit verwendet wurde, kann allerdings in gewissen Fällen fehlerbehaftet sein. Hinzu kommt, dass bei Einsatz eines Spektralphotometers die untere Nachweisgrenze bei $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ liegt, so dass Proben mit sehr geringen Mengen an Nukleinsäuren nicht oder nur mit einer unzureichenden Genauigkeit quantifiziert werden können. Weiterhin unterliegt die Gesamt-RNA-Konzentration bedingt durch experimentelle Veränderungen und die verschiedenen Wachstumsphasen, in denen sich die Zellen befinden, gewissen Schwankungen [36].

Ein weiterer Nachteil bei Verwendung von Gesamt-RNA als Bezugssystem besteht darin, dass eine interne Kontrolle während der reversen Transkription fehlt und eventuelle Schwankungen in der Reaktionseffizienz beim Umschreiben der RNA in cDNA nicht berücksichtigt werden. Weiterhin ist zu beachten, dass die mRNA nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamt-RNA ausmacht, was zu einer Unverhältnismäßigkeit führt und deshalb von diesem Bezugssystem abzuraten ist.

Bei den hier untersuchten Proben liegt das Konzentrationsverhältnis von Gesamt-RNA zu *glaA*-mRNA im Durchschnitt bei 10^{-5} bis 10^{-6} , während das durchschnittliche Verhältnis der *glaA*-mRNA zum geometrischen Mittelwert der Referenzgene weniger als 30 beträgt. Die Normalisierung mit Referenzgenen hat demzufolge den Vorteil, dass die Transkriptmengen dieser Gene in ähnlicher Größenordnung liegen wie die *glaA*-Transkriptmengen, wodurch auch kleine Änderungen in der zu quantifizierenden mRNA-Menge erkannt werden können. Außerdem durchläuft die mRNA der Referenzgene dieselben Schritte der Probenaufbereitung, inklusive der cDNA Synthese, wie die zu quantifizierende mRNA, was für die Gesamt-RNA nur zum Teil gegeben ist, da sie bereits vor der Reversen Transkription quantifiziert werden muss. Hier liegt auch der entscheidende Vorteil der Verwendung von Referenzgenen als Bezugssystem. Ein weiterer Vorteil der Referenzgene ist, dass diese auch verwendet werden können, wenn nur geringe Mengen an Probenmaterial zur Verfügung stehen, oder die Gesamt-RNA-Konzentration sehr gering ist. Allerdings kann es auch bei den Referenzgenen zu geringen Schwankungen in den Transkriptmengen unter sich verändernden experimentellen Bedingungen kommen, wobei diese jedoch bestimmt und die am stabilsten expimierten Gene analysiert werden können (Kapitel 2.5).

Diese ersten Resultate der quantitativen Bestimmung spezifischer mRNA von *A. niger* aus verschiedenen Kultivierungen zeigen, dass die hier entwickelte Quantifizierungsmethode, welche auf der Echtzeit-PCR beruht, geeignet ist, um Informationen über die Produktbildung auf genetischer Ebene zu erhalten. In Kombination mit der Quantifizierung des Zielproteins während der Kultivierung können somit zusätzlich eventuell auftretende Limitierungen von der Transkription über die Translation bis hin zum fertigen Protein aufgedeckt werden und die gewonnenen Informationen für die Optimierung unter anderem von Induktionsstrategien hinsichtlich der Produktausbeute verwendet werden. Weiterhin wurde die Eignung von zwei Bezugssystemen untersucht und diese miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Gesamt-RNA für die

Abschätzung des Verlaufs der Transkriptkonzentrationen zwar genutzt werden kann, die relativ stabil exprimierten Referenzgene aber ein genaueres und damit besseres Bezugssystem darstellen.

4.3 GlaA-Genexpression bei verschiedenen Kultivierungsstrategien

Aspergillus niger ist bekannt für seine hohe Sekretionsleistung von homologen Proteinen wie beispielsweise dem pilzeigenen Enzym Glucoamylase. Die Glucoamylaseproduktion mit diesem Pilz gehört mit zu den wichtigsten biotechnologischen Prozessen. Das dazugehörige Gen der Gexpression von Glucoamylase wird dabei von einem starken und induzierbaren Promotor kontrolliert, welcher aufgrund dieser Eigenschaft auch zur Genexpression pilzfremder Proteine verwendet wird [18]. Für die Optimierung eines solchen Produktionsprozesses ist eine umfassende Charakterisierung der Produktbildung erforderlich. Hier gilt es, auftretende Limitierungen des Produktbildungsprozesses auf zellulärer Ebene aufzudecken, um letztlich die Produktausbeute optimieren zu können. Dabei spielt besonders die Regulation des Genexpressionsystems eine sehr wichtige Rolle. Untersuchungen in diesem Zusammenhang haben gezeigt, dass die Glucoamylasesynthese vom Transkriptionslevel, also von der *glaA*-mRNA-Menge abhängig ist [19], [16]. Die Regulation der *glaA*-Genexpression konnte allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden [19], [75]. Untersuchungen von Fowler et al. [21] und Verdoes et al. [68] zeigten, dass die Menge an *glaA*-mRNA mit der des gebildeten Proteins Glucoamylase korreliert. Dabei ist die Menge an gebildeter mRNA ein Maß für die Aktivität eines Gens, welche hier im Falle des Gens *glaA* unter verschiedenen experimentellen Einflüssen und unterschiedlichen Induktionsstrategie und Kultivierungsbedingungen untersucht wurde, um eventuell auftretende Limitierungen auf genetischer Ebene und den Einfluss sich ändernder Kultivierungsparameter bereits zum Zeitpunkt der Genexpression nachzuweisen und somit den Produktionsprozess auf eine optimale Produktbildung auszurichten.

Mittels der für *A. niger* entwickelten mRNA-Quantifizierungsmethode (Kapitel 4.1 und 4.2) wurden erste Studien zur *glaA*-Genexpression in *A. niger* durchgeführt. Hier wurden Kultivierungen betrachtet, die sich hinsichtlich ihrer Kohlenstoffquelle, des verwendeten Induktors und durch den Zeitpunkt der Induktion unterschieden. Die Probenvorbereitung, die cDNA Synthese sowie die Echtzeit-PCR wurden wie in den Kapiteln 3.5 und 3.8, erläutert durchgeführt. Zudem wurde die Enzymaktivität der Glucoamylase wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben bestimmt.

4.3.1 Batch-Kultivierung mit Xylose und ohne Induktion

Bei dieser Kultivierung 6 (Batch-Kultivierung mit Xylose als C-Quelle, siehe Kapitel 3.3) wurde wie bei der Kultivierung 1 Xylose als C-Quelle verwendet, nur dass bei dieser Kultivierung keine Induktion des *glaA*-Promotors stattfand. Der Verlauf der Transkriptmengen und der Glucoamylaseaktivität ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

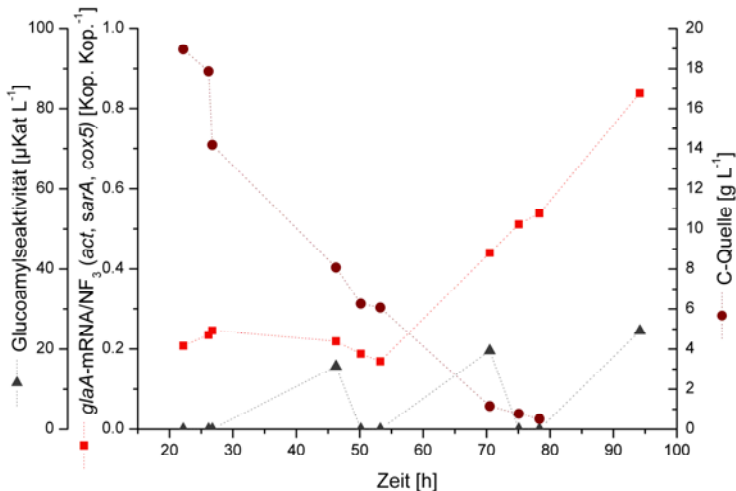


Abbildung 4.9 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen und der Glucoamylaseaktivität sowie der Konzentration der Kohlenstoffquelle (C-Quelle) einer Batch-Kultivierung (6: mit Xylose ohne Induktion).

Wie erwartet wurden hier bis auf eine genetische Grundaktivität keine wesentlichen *glaA*-Transkriptmengen gebildet. Bereits Fowler et al. [16] konnte mit Xylose als C-Quelle keine Induktion der Glucoamylasesynthese beobachten. Dieses konnte auch später Ganzlin nachweisen [73]. Die Erhöhung der *glaA*-mRNA-Menge nach 53 Stunden lässt sich durch den Einfluss des verwendeten Bezugssystems erklären, siehe Kapitel 4.2.1.3.

4.3.2 Batch-Kultivierung mit Xylose und Induktion durch Maltosepulvs

In dieser Kultivierung 1 (Batch-Kultivierung mit Xylose und Induktion durch Maltosepulvs (5,5 g L⁻¹), siehe Kapitel 3.3) zeigte sich nach Zugabe von Maltose bei einer Kultivierungszeit von 50 Stunden eine Induktion des *glaA*-Promotors, was durch einen Anstieg der *glaA*-mRNA-Menge dargestellt in Abbildung 4.10

zu beobachten ist. Zu diesem Zeitpunkt waren 63 % der maximalen Biomassekonzentration erreicht, die Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Transkription des *glaA*-Gens erfolgt dabei scheinbar mit einer geringen Zeitverzögerung zur Induktion. Drei Stunden nach Induktion mit Maltose war die *glaA*-mRNA-Menge signifikant bis zu einem Wert von 51 Kopien pro Normalisierungsfaktor angestiegen.

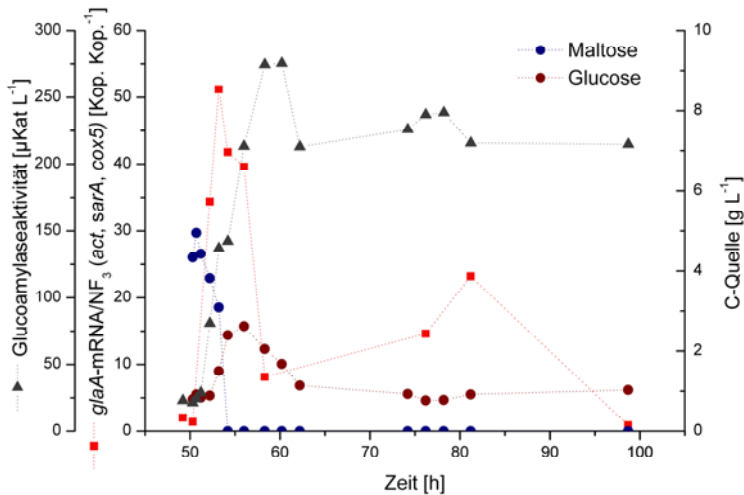


Abbildung 4.10 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen und der Glucoamylaseaktivität sowie der Konzentration der Kohlenstoffquellen der Batch-Kultivierung 1 (Batchkultivierung auf Xylose, mit Induktion des *glaA*-Promotors durch Maltosepulvs (5,5 g L⁻¹).

Bereits zwei Stunden nach Induktion mit Maltose wird die enzymatische Wirkung der Glucoamylase anhand der raschen Abnahme an Maltose und der Zunahme an Glucose deutlich. Die maximale Enzymaktivität des Proteins Glucoamylase von 276 µKat L⁻¹ wurde nach 60 Stunden Kultivierungszeit und 7 Stunden nach Erreichen der maximalen Transkriptmenge gemessen. Ab der Kultivierungszeit von 62 Stunden blieb die Proteinkonzentration konstant.

Die *glaA*-mRNA-Menge fiel unmittelbar nach dem Erreichen des Maximums 3 Stunden nach Induktion signifikant wieder ab. Das Absinken der *glaA*-Transkriptmenge kann verschiedene Ursachen haben, zum einen befindet sich die Biomasse am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, was vermutlich zum Einstellen der Glucoamylasesynthese führt. Weiterhin könnte die abnehmende Maltosekonzentration für das Absinken der *glaA*-Transkriptmenge verantwortlich sein. Allerdings kann hier ein Mangel an Induktor ausgeschlossen werden, da Glucose, welche zwei Stunden nach Induktion als ein Spaltprodukt aus der Maltosehydrolyse durch Glucoamylase gebildet wird, ebenfalls eine induzierende Wirkung auf den *glaA*-Promotor hat [16], [73].

Abbildung 4.11 zeigt die *glaA*-mRNA-Konzentration und die Glucoamylasebildungsrate.

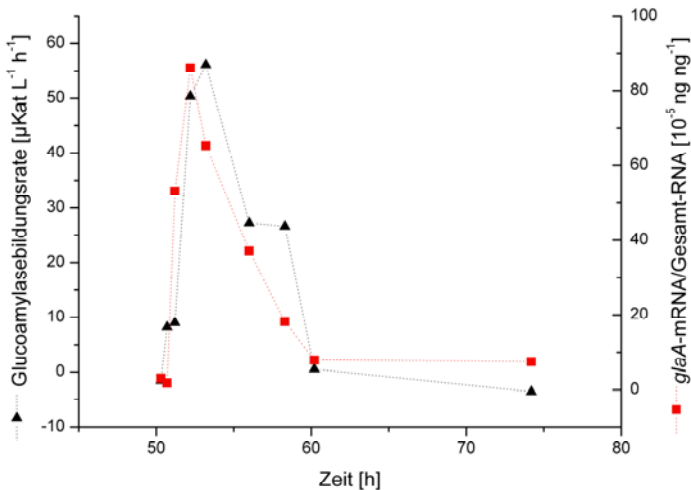


Abbildung 4.11 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen und der Glucoamylasebildungsrate über der Kultivierungszeit der Kultivierung 1 (Batchkultivierung auf Xylose, mit Induktion des *glaA*-Promotors durch Maltosepuls ($5,5 \text{ g L}^{-1}$)).

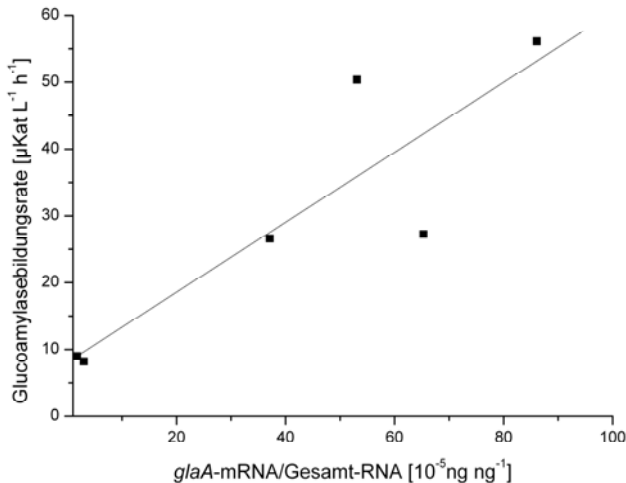


Abbildung 4.12 Korrelation zwischen *glaA*-mRNA-Konzentration und der Glucoamylasebildung.

In **Abbildung 4.12** wurde die Glucoamylasebildungsrate gegen die *glaA*-mRNA-Konzentration aufgetragen. Die Darstellung deutet auf eine Korrelation zwischen der *glaA*-mRNA-Konzentration und der Proteinbildungsrate hin. Allerdings werden hier noch wesentlich mehr Messpunkte benötigt, um eine eindeutige quantitative Aussage über die Produktbildung treffen zu können. Bei der Kultivierung 3 (siehe Abbildung 4.13) konnte solch ein Zusammenhang allerdings nicht festgestellt werden, da hier zu wenig Messpunkte vorhanden waren (Kapitel 4.3.3).

4.3.3 Fedbatch-Kultivierung mit Induktion durch Glucose zu Kultivierungsbeginn

Die Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse einer Kultivierung 3 (Fedbatch-Kultivierung mit Induktion durch Glucose zu Kultivierungsbeginn, siehe Kapitel 3.3), in

welcher Glucose, ebenfalls ein Induktor der Glucoamylasesynthese von Kultivierungsbeginn an im Medium enthalten war. Ab 40 Stunden der Kultivierungszeit wurde Glucose auch als C-Quelle kontinuierlich zugegeben. Obwohl die Induktion der Glucoamylasesynthese bereits zu Beginn der Kultivierung erfolgte, war erst nach 40 Stunden der Kultivierung eine maximale Transkriptmenge von 18,3 Kopien *glaA*-mRNA pro Normalisierungsfaktor zu verzeichnen.

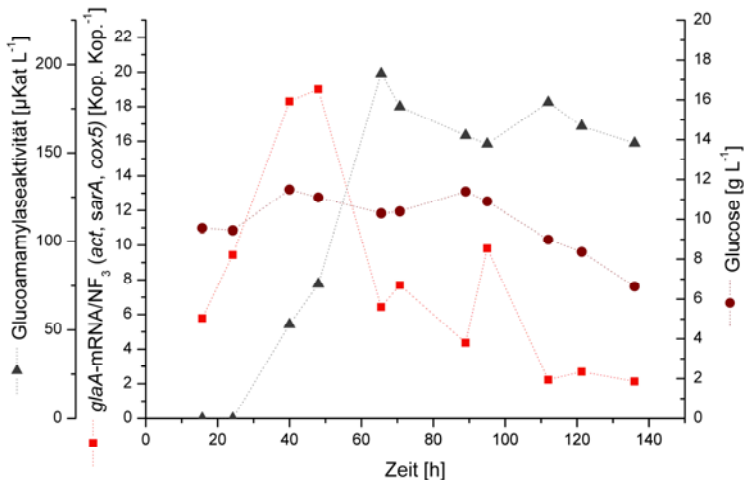


Abbildung 4.13 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen und der Glucoamylaseaktivität sowie der Konzentration der Kohlenstoffquelle einer Fedbatch-Kultivierung 3 (Fedbatchkultivierung mit Induktion durch Glucose zu Kultivierungsbeginn), kontinuierliche Zugabe von Glucose (6,5 g L⁻¹ für ab 40 Stunden).

Die späte Reaktion der Pilzzellen auf die Induktion ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese erst nach ca. 20 Stunden an das Milieu angepasst waren und mit der Glucoamylasesynthese beginnen konnten. Nach 48 Stunden sank die *glaA*-Transkriptmenge wie in Kultivierung 1 wieder ab. Ausgeschlossen werden kann hier ein Mangel an Induktor oder ein Mangel an Stoffwechselaktivität der Zellen, denn zu diesem Zeitpunkt lagen erst 26 % der maximalen Biomassekonzentration im Reaktor vor. Das Protein erreichte 65 Stunden nach dem Animpfen seine maximale Enzymaktivität von 195 µKat L⁻¹ und blieb dann nahezu konstant.

Aufgrund der Proteasedefizienz des hier verwendeten Stammes *A. niger* AB1.13 [76] war wie auch bei der Kultivierung 1 kein Abbau des Proteins zu verzeichnen.

4.3.4 Vergleich der Kultivierungen hinsichtlich der *glaA*-Transkriptmenge

Der Vergleich der Kultivierung 3 (Fedbatch-Kultivierung mit Glucose) Abbildung 4.13 mit Kultivierung 1 (Batch-Kultivierung mit Xylose und Maltosepulvs nach 50 Stunden zur Induktion des *glaA*-Promotors) Abbildung 4.10, welche in Kapitel 4.3.2 erläutert wurden, zeigt zunächst, dass sich die Zeitspanne von der Induktion bis zum Erreichen der maximalen Transkriptmenge wesentlich unterscheidet. Bei der Fedbatch-Kultivierung war diese länger (40 Stunden nach Kultivierungsbeginn und Induktion) als bei der Batch-Kultivierung, in der bereits drei Stunden nach Induktion die maximale Transkriptmenge erreicht wurde. Hierfür könnte der Zeitpunkt der Induktion verantwortlich sein. Während der Induktion in der Batch-Kultivierung 1 (50 Stunden Kultivierungszeit) waren die Zellen bereits in der exponentiellen Wachstumsphase und konnten somit schneller auf die Induktion reagieren als bei der Fedbatch-Kultivierung 3, bei welcher bereits kurz nach dem Animpfen des Reaktors der Induktor vorlag.

Der rapide Abfall der *glaA*-mRNA-Menge bei den Kultivierungen 1 (58 Stunden der Kultivierung, 8 Stunden nach Induktion) und Kultivierung 3 (48 Stunden nach Kultivierungsbeginn und Induktion) macht deutlich, dass die transkriptionelle Aktivität des Glucoamylaseexpressionsystems jeweils limitiert ist. Ein Grund für dieses Absinken der *glaA*-mRNA-Menge während der Kultivierung 1 könnte mit der direkten Kopplung der Transkription an das Zellwachstum zusammenhängen, denn zu dem Zeitpunkt des Absinkens befand sich der Pilz am Ende der Hauptwachstumsphase, was vermutlich zur Limitierung der Einstellung der *glaA*-mRNA-Synthese führte. Allerdings zeigt sich in der Fedbatch-Kultivierung ebenfalls ein Abfall der relativen Transkriptmengen, obwohl hier erst 26 % der maximalen Biomassekonzentration erreicht waren.

Ausgeschlossen werden kann bei beiden Kultivierungen zunächst eine Limitierung, welche durch einen Mangel an Substrat oder Induktor verursacht wurde, denn zum Zeitpunkt des rapiden Abfalls der Transkriptmengen waren stets ausreichend Induktor und Substrat vorhanden. Kurz nach der Induktion der Batch-Kultivierung war zwar der Induktor Maltose aufgebraucht, aber das Spaltprodukt Glucose lag zum Zeitpunkt des rapiden Abfalls der *glaA*-mRNA-Menge in ausreichender Menge vor und konnte den *glaA*-Promotor und somit die Glucoamylasesynthese statt der Maltose induzieren (siehe Abbildung 4.10 und Abbildung 4.13).

Eine weitere Erklärung für den Abfall der *glaA*-mRNA-Menge könnte eine Repression der *glaA*-Transkription sein, welche durch einen Rückkopplungsmechanismus aufgrund der Anhäufung des Proteins in der Kulturbrühe verursacht wurde. Im Falle der Glucoamylaseexpression sind dazu noch keine Erkenntnisse bekannt. Hier ist lediglich eine Glucoserepression bei starken Promotoren bekannt, welche Gene regulieren, die wie im Falle der Glucoamylase für hydrolytische Enzyme kodieren [22]. Allerdings konnte in dieser Arbeit bei den hier für die Kultivierungen verwendeten Glucosekonzentrationen (20 g L^{-1} , bzw. 10 g L^{-1}) keine Hemmung der Glucoamylasesynthese festgestellt werden.

Weiterhin wurden während der Batch-Kultivierung mit Maltoseinduktion höhere Kopienzahl an *glaA*-mRNA gemessen, als bei der glucoseinduzierten Fedbatch-Kultivierung, was Daten aus der Literatur bestätigt in der ebenfalls Maltose als ein besserer Induktor als Glucose bezeichnet wird [16].

Durch die Quantifizierung der *glaA*-mRNA mittels Echtzeit-PCR konnte auf genetischer Ebene zusätzlich zur Glucoamylaseaktivität gezeigt werden, dass beide Kultivierungsstrategien zur Glucoamylaseherstellung geeignet sind. Allerdings resultiert aus der Induktion des *glaA*-Promotors mit Maltose eine höhere *glaA*-mRNA-Menge sowie in einer höheren Glucoamylaseaktivität. Daher wird hier vorgeschlagen, die Induktion mit Maltose durchzuführen. Eine höhere Genaktivität bei Induktion des *glaA*-Promotors mit Maltose wurde unter anderen

auch von Ganzlin [73] festgestellt. Weiterhin zeigt der Verlauf der *glaA*-Transkriptmengen während der Batch-Kultivierung, dass eine höhere Produktausbeute erhalten wird, wenn die Induktion dann erfolgt, wenn sich die Zellen bereits in der exponentiellen Phase befinden und ausreichend Zeit hatten, sich an das Milieu anzupassen. Allerdings sollte die Induktion deutlich bevor Limitierungen auftreten erfolgen.

4.3.5 Untersuchung zur genetischen Rückkopplung der Glucoamylasessynthese

Weitergehende Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem oben beschriebenen rapiden Abfall der *glaA*-Transkriptmengen tatsächlich um eine genetische Rückkopplung der *glaA*-mRNA-Synthese handelt, was im direkten Zusammenhang mit der Bildung des dazugehörigen Proteins steht. Hierfür wurden Batch-Kultivierungen mit Glucose als C-Quelle und Induktor wie bei der bereits vorgestellten Kultivierung 3 durchgeführt (Kultivierungsbedingungen siehe Kapitel 3.3). Zusätzlich wurden dem Medium direkt nach dem Animpfen des Reaktors $130 \mu\text{Kat L}^{-1}$ Glucoamylase (Biochemica 10115, Firma Sigma Adrich Fluca) beigelegt (Batch-Kultivierung 7), was ungefähr der Menge an Glucoamylase entspricht, welche zum Zeitpunkt des Abfalls der *glaA*-Transkriptmenge während der Kultivierung 1 (Batch-Kultivierung mit Xylose, nach 50 Stunden Kultivierung: Induktion des *glaA*-Promotors durch $5,5 \text{ g L}^{-1}$ Maltosepuls) entspricht, sowie $450 \mu\text{Kat L}^{-1}$ Glucoamylase vorgelegt (Kultivierung 8: Glucose als C-Quelle zu Beginn der Kultivierung). Die Probenahme, Probenaufbereitung, Gesamt-RNA-Bestimmung und die sich anschließende cDNA-Synthese sowie die Echtzeit-PCR-Messung erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Die so erhaltenen Daten wurden anschließend wie in Kapitel 3.8.4 erläutert, ausgewertet.

Neben der *glaA*-Transkriptmenge wurden die Biotrockenmasse und die Glucoamylase-Enzymaktivität mittels PNPG-Test, wie in Kapitel 3.4.1 bzw. 3.4.2

aufgezeigt bestimmt über der Kultivierungszeit aufgetragen und in **Abbildung 4.14** und **Abbildung 4.15** dargestellt.

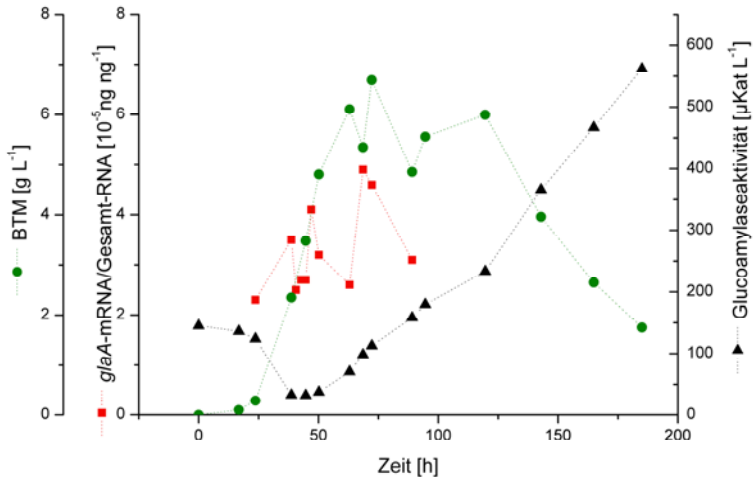


Abbildung 4.14 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen, der Glucoamylaseaktivität und der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration einer Batch-Kultivierung 7 (Glucose als C-Quelle, Vorlage von 130 µKat L⁻¹ Glucoamylase zu Beginn der Kultivierung).

Zunächst ist zu beobachten, dass bei beiden Kultivierungen sehr geringe *glaA*-Transkriptmengen gemessen wurden. Bei der Kultivierung mit 130 µKat L⁻¹ Glucoamylase (Abbildung 4.14) wurde eine maximale *glaA*-Transkriptmenge von $4,9 \cdot 10^{-5}$ ng pro ng Gesamt-RNA erreicht, dieser Wert ist nur dreimal so hoch wie der des *glaA*-mRNA-Grundlevels, wie er bei der Kultivierung 6 ohne Induktion bestimmt wurde.

Wird nun die Menge an Glucoamylase im Medium erhöht, so dass sich 450 µKat L⁻¹ Glucoamylase im Medium befinden, werden noch niedrigere Werte für die *glaA*-mRNA-Menge gemessen, welche in Abbildung 4.15 dargestellt sind.

Hier wurde lediglich ein Grundlevel an *glaA*-mRNA in etwa der gleichen Größe wie auch bei der Kultivierung 6 ohne Induktion bestimmt.

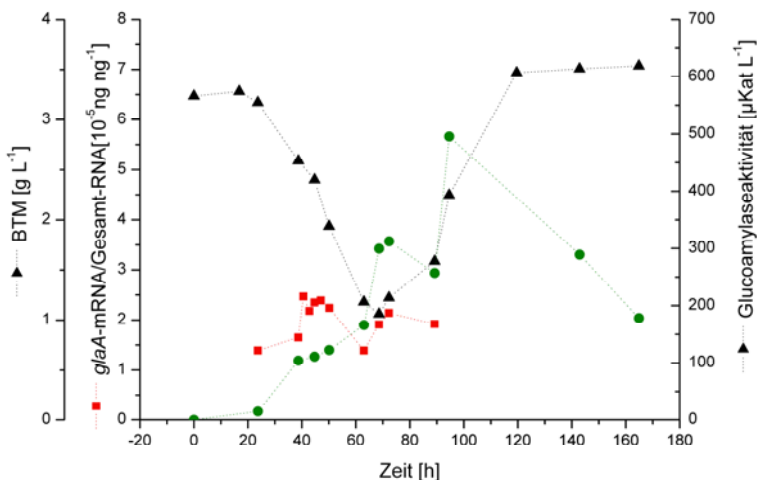


Abbildung 4.15 Verlauf der *glaA*-mRNA-Mengen, der Glucoamylaseaktivität sowie der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration einer Batch-Kultivierung 8 (Glucose als C-Quelle, Vorlage von 450 µKat-L-1 Glucoamylase zu Beginn der Kultivierung).

Die Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass die Anreicherung von Glucoamylase im Medium einen wesentlichen Einfluss auf den *glaA*-mRNA-Level hat und somit auch die Menge an gebildeter *glaA*-mRNA reguliert, was demzufolge auf eine genetische Rückkopplung hindeutet.

Bei der Kultivierung 8 könnte vermutet werden, dass die geringe *glaA*-Transkriptmenge auch auf die niedrige Biotrockenmassekonzentration von weniger als 3 g L⁻¹ zurückzuführen ist. Allerdings sind die Transkriptmengen relativ zur Gesamt-RNA aufgetragen, so dass diese Vermutung unwahrscheinlich ist.

Die Ergebnisse der Glucoamylaseaktivität mittels PNPG-Test sind ebenfalls in Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15 dargestellt. Bei der Kultivierung 7 wurde zu Beginn eine Gesamt-Glucoamylaseaktivität von $145 \mu\text{Kat L}^{-1}$ gemessen, was ungefähr der Menge an Glucoamylase entspricht, die dem Medium zu Beginn der Kultivierung hinzugefügt worden ist. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es zu einer Zunahme der Glucoamylaseaktivität in der Bulkphase bis ein Maximalwert von $561 \mu\text{Kat L}^{-1}$ nach 185 Stunden erreicht wurde. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten angesichts der gemessenen geringen *glaA*-mRNA-Konzentration. Auch die zweite Kultivierung in diesem Zusammenhang zeigte eine Zunahme der Gesamt-Glucoamylaseaktivität um $124 \mu\text{Kat L}^{-1}$. Hier war allerdings eine etwas geringere Zunahme der Glucoamylaseaktivität zu verzeichnen als bei der Kultivierung 7, was auf das geringe Wachstum des Pilzmyzels während dieser Kultivierung zurückzuführen ist. Auch hier ist nicht klar, warum die Gesamt-Glucoamylaseaktivität zunahm, obwohl nur ein sehr geringer Level an *glaA*-mRNA vorhanden war, ähnlich wie bei der Kultivierung 6 (Kultivierung ohne *glaA*-Induktion), bei der trotz gleicher *glaA*-mRNA-Menge lediglich ein Grundlevel an Glucoamylaseaktivität (maximal $25 \mu\text{Kat L}^{-1}$) verzeichnet wurde.

Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass hier keine direkte Korrelation zwischen mRNA und Protein im Falle des Glucoamylaseexpressionssystems besteht und auch eine geringe Menge an mRNA ausreicht, um eine relativ hohe Menge an Protein zu synthetisieren, was eine hohe Translationsrate der mRNA über die tRNA zum Protein bedeuten würde. Ein weitere Vermutung ist, dass es sich bei dem hier mittels PNPG-Test nachgewiesenen Protein nicht allein um Glucoamylase handelt, sondern noch andere Proteine mit bestimmt wurden. In diesem Zusammenhang konnte von Emmeler gezeigt werden [10], dass Enzyme wie α -Glucosidase und α -Amylase, welche ebenfalls von *A. niger* synthetisiert werden auch spezifisch mit diesem Enzym-Aktivitätstest nachgewiesen werden können und sich somit störend auf die Quantifizierung von Glucoamylase auswirken.

Diese ersten kultivierungsbegleitenden *glaA*-mRNA-Quantifizierungen haben gezeigt, dass es im Falle des Glucoamylaseexpressionssystems durch die Quantifizierung der *glaA*-mRNA möglich ist, eine Aussage über die Aktivität des *glaA*-Gens zu treffen und auftretende Limitierungen bereits auf genetischer Ebene zu erfassen. Weiterhin haben sich die Vermutungen erhärtet, dass die Anhäufung des Enzyms Glucoamylase im Kulturüberstand einen negativen Einfluss auf die Transkriptmenge der *glaA*-mRNA hat und es womöglich deshalb während der betrachteten Kultivierungen zu einem Abfall der *glaA*-Transkriptmengen kam.

5 Zusammenfassung

Für Untersuchungen der Genexpression auf der Ebene der Transkription findet die Echtzeit-PCR aufgrund ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit sowie der Möglichkeit, Nukleinsäuremoleküle quantifizieren zu können, in vielen Bereichen der Medizin und Biologie ihre Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Technik ein Verfahren zur Quantifizierung spezifischer mRNA aus *Aspergillus niger* entwickelt, um eine Aussage über die Genaktivität des Glucoamylaseexpressionssystems zu treffen.

Um dies zu realisieren, wurde zunächst die Methodik von der Probennahme über den Aufschluss der Pilzzellen, die RNA-Gewinnung, die cDNA Synthese bis hin zur quantitativen Messung mittels Echtzeit-PCR optimiert.

Für die Auswertung der Echtzeit-PCR Daten für die quantitative Analyse von spezifischer mRNA wurden zwei Methoden hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Auswertung der Echtzeit-PCR Daten über die Wendestelle der sigmoidalen Echtzeit-PCR-Fluoreszenzsignalkurve (X_{SDM} -Wert) reproduzierbarere Ergebnisse liefert als die Auswertung mittels des Fluoreszenzschwellenwertzyklus (Ct-Wertes).

Weiterhin wurde jeder Schritt, der für die Quantifizierung der mRNA notwendig ist, hinsichtlich seiner Reproduzierbarkeit untersucht. Hierbei ergab sich beispielsweise für die quantitative Analyse einer Probe, welche 30-fach in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt wurde, eine relative Standardabweichung der cDNA-Konzentration von 22,1 %. Da sich für die cDNA-Synthese mit anschließender Echtzeit-PCR-Messung Standardabweichungen in ähnlicher

Größenordnung ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass die Reverse Transkription mit dem optimierten Protokoll reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Für die Gewinnung und Aufreinigung der Gesamt-RNA ergab sich allerdings eine wesentlich schlechtere Reproduzierbarkeit, was darauf hindeutet, dass es besonders während der Aufarbeitung zu Verlusten an RNA kommt. Um die während der Probenaufbereitung auftretenden RNA-Verluste auszugleichen, wird ein Bezugssystem benötigt, welches die gleichen Arbeitsschritte durchläuft und denselben Einflüssen ausgesetzt ist, wie die zu quantifizierende mRNA.

Ein solches Bezugssystem stellen Gene dar, deren Transkriptmengen unabhängig von experimentellen Bedingungen einen stabilen Expressionslevel aufweisen und die sich somit als Bezugssystem zur Normalisierung von *glaA*-mRNA-Mengen eignen. Dazu wurden mehrere für den Pilz *A. niger* spezifische Gene untersucht, die am Erhaltungsstoffwechsel beteiligt sind und somit eine relativ stabile Expression aufweisen sollten. Für die Untersuchung der Expressionsstabilität dieser ausgewählten Gene wurden Proben aus fünf unterschiedlichen Kultivierungen mit der von Vandesompele et al. [1] beschriebenen Methode zur Bestimmung geeigneter Referenzgene ausgewertet. Auf diese Weise konnten zehn in die Untersuchung einbezogenen Gene hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität sortiert und analysiert werden. Als die drei am stabilsten exprimierten Gene erwiesen sich das Gen, welches für das Strukturprotein Actin (*act*), das sekretionsassoziierte Ras-Protein (*sarA*) und die Cytochrom C-Oxidase Untereinheit (*cox5*) kodiert und somit zur Normalisierung der mittels Echtzeit-PCR quantifizierten *glaA*-mRNA-Mengen eingesetzt werden können. Im Vergleich zur Gesamt-RNA als Bezugssystem stellten sich im Hinblick auf die Genauigkeit der Quantifizierung gewisse Vorteile bei der Nutzung von Referenzgenen als Bezugssystem heraus. Grund hierfür ist vermutlich, dass die mRNA-Mengen der Referenzgene in einer ähnlichen Größenordnung vorliegen wie die *glaA*-Transkriptmenge, während die Menge der Gesamt-RNA in Größenordnung höher als die *glaA*-mRNA-Menge ist. Hinzu kommt, dass die Effizienzunterschiede der reversen Transkription bei der Normalisierung mittels

der Referenzgene zusätzlich mit berücksichtigt werden. Dennoch ist bei Nutzung von Gesamt-RNA als Bezugssystem eine tendentielle Aussage über den Verlauf von Transkriptmengen während einer Kultivierung möglich und in bestimmten Fällen hinsichtlich des geringeren Zeitaufwandes zu bevorzugen.

Die hier etablierte Methode wurde zur Quantifizierung von mRNA bei mehreren Kultivierungen eingesetzt, um so eine Aussage über die Genaktivität des Pilzes hinsichtlich der Glucoamylaseproduktion über die Kultivierungszeit zu treffen.

Die Betrachtung von drei Kultivierungen (Kultivierung 1: Batch-Kultivierung, Induktion nach 50 Stunden durch Maltosepuls, Kultivierung 3: Fedbatch-Kultivierung, Induktion durch Glucose zu Beginn und kontinuierliche Zudosierung von Glucose ab 40 Stunden, Kultivierung 6: Batch-Kultivierung ohne Induktion) ergab eine höhere Produktivität der Pilzzellen bei der Kultivierung 1 im Gegensatz zur Kultivierung 3, sowohl in Bezug auf die *glaA*-Transkriptbildung als auch auf die Glucoamylasesynthese, was auf eine bessere Induktion durch Maltose als durch Glucose hindeutet.

Die ersten hier gezeigten Untersuchungen der *glaA*-mRNA-Transkriptmengen zeigten, dass die Methode eingesetzt werden kann, um Limitierungen auf Transkriptionsebene bezüglich der Glucoamylasesynthese zu untersuchen. Um allerdings eine genaue Aussage über die zu erwartende Produktmenge auf genetischer Ebene treffen zu können, muss zunächst die Korrelation der *glaA*-Transkriptmenge mit der Glucoamylasesynthese noch bestätigt werden. Hierzu sollten zunächst noch weitere Kultivierungen betrachtet und kleine Probennahmeintervalle gewählt werden.

Die Verläufe der Transkriptmengen, der hier untersuchten Kultivierungen deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anreicherung des Proteins und dem Abfall der *glaA*-Transkriptmengen gibt. Hierzu wurden Versuche durchgeführt in denen bereits zu Beginn jeder Kultivierung dem Medium

Glucoamylase zugesetzt wurde. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glucoamylase im Medium einen Einfluss auf den *glaA*-mRNA Level hat und somit auch die Menge an *glaA*-mRNA reguliert.

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss verschiedener Induktionstrategien auf die Menge an *glaA*-Transkripten mittels Echtzeit-PCR untersucht werden, um die Funktionsweise dieses Expressionssystems noch weiter aufzudecken und um die Ausbeute an Protein noch zu steigern.

Im Hinblick auf die Produktion heterologer Proteine mit dem Glucoamylaseexpressionssystem kann die hier etablierte Methode leicht an das neue Protein angepasst und Genexpressionsstudien zur Optimierung des Kultivierungsprozesses durchgeführt werden.

Weiterhin sollten die Untersuchungen mittels Echtzeit-PCR auch auf andere Gene, wie beispielsweise Sekretionsproteine oder Stressproteine ausgeweitet werden um hier den Einfluss verschiedenster Kultivierungsparameter auf die Zellen zu untersuchen und diese für neue Optimierungsstrategien zu verwenden.

6 Anhang

6.1 Verwendete Geräte, Kits und Chemikalien

Geräte	Modell	Firma
Autoklav	5075 ELV	Systec
22 L-Bioreaktor	NLF22	Bioengineering
3 L-Bioreaktor		Applikon
Echtzeit-PCR-Gerät	iCycler™ iQ	Bio-Rad
Elektrophoresesystem	Agagel Maxi	Biometra
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LD	Christ
HPLC-Detektor	RI-Detektor, L-7490	Merck Hitachi
HPLC-Injektor	Autosampler,L-7200	Merck Hitachi
HPLC-Interface	D-7000	Merck Hitachi
HPLC-Pumpe	L-7110	Merck Hitachi
Kamera	Gel Cam	Polaroid
Mini-Tischzentrifuge	Galaxy Mini	VWR
Mörsermühle	RM 100	Retsch
Mörsermühle	RMI 0	Retsch
Photometer	Smart Spec™ 3000	Bio-Rad

Regelungseinheit	DCU	B. Braun Biotech Intern.
Reagenzglasschüttler	Reax Top	Heidolph
Spektrophotometer	ND - 1000	NanoDrop
sterile Werkbank	Hera safe 18	Heraeus / Kendro
Thermoblock	HBT 130	HLC
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus / Kendro
Trockenschrank	UT 6420	Heraeus / Kendro
UV-Tisch	HPUT	UVP Ultra-Violet-Products
Waage	LA 5200 P	Sartorius
Feinwaage	CP 225 D	Sartorius

Kit	Firma
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen
100 mM Desoxy-Nukleotid-triphosphat (dNTPs) Set	Invitrogen
RNaseOUT (rekombinanter Ribon-uklease Inhibitor) 40 U μL^{-1}	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase (5 U μL^{-1})	Invitrogen
10 fach PCR Puffer, ohne Mg	Invitrogen
100 mM Desoxy-Nukleotid-triphosphat (dNTPs) Set	Invitrogen
Oligo (dT)20 Primer 50 μM	Invitrogen

Taq DNA Polymerase (5 U μL^{-1}) 10 fach PCR Puffer, MgCl_2 -Lösung (50 mM)	Invitrogen
LUX TM -Primer 100 μM	Invitrogen
Primer 100 μM	Invitrogen

Chemikalie	chemische Formel bzw. Abkürzung	Reinheit	Firma
Agarose low EEO		für analyt. Zwecke	AppliChem
Agarose MP		für präp. Zwecke	AppliChem
Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		Merck
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	technisch	Merck
Borsäure	H_3BO_3	technisch	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck
Citronensäure-Hydrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	chem. rein	Merck
DNase off			AppliChem
Essigsäure (konz.)	CH_3COOH	p.a.	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (1%)	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$		Merck
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$	chem. rein	Merck
Glucose-Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	chem. rein	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	technisch	Merck
Kupfer(II)-sulfat	CuSO_4		Merck
Ladepuffer 6 fach (Triple Dye)			Biozym

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	extra pure	Merck
Mangansulfat-Hydrat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Baker grade	J.T. Baker
Natriumacetat	CH_3COONa	99,0% p.a	Merck
Natriumchlorid	NaCl	p.a	Merck
Natriummolybdat-Hydrat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		Merck
Natriumtetraborat-Decahydrat (Borax)	$\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,5\%$	Fluka
4-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid	PNPG	$\geq 98,0\%$ (HPLC)	Fluka
RNase off			AppliChem
Schwefelsäure (konz.)	H_2SO_4	p.a.	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	ultra pure	Biosolve LTD
Uridin	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	$\geq 99 \%$	Merck
Xylose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	$\geq 98 \%$	Merck
Zinksulfat-Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	reinst	Merck

6.2 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

- **Agarosegel 2,5%**
 - Agarose 25 g
 - TAE-Puffer 1fach 1000 mL
- **TAE-Puffer 10fach**
 - TRIS 48,4 g L⁻¹
 - EDTA 7,32 g L⁻¹
 - konzentrierte Essigsäure 11,4 mL L⁻¹

-
- **TE-Puffer (pH 8)**
 - TRIS 1,21 g L⁻¹
 - EDTA 372 mg L⁻¹
 - **Ethidiumbromidlösung**
 - Ethidiumbromidlösung 1 % 100 µL L⁻¹
 - **Medium für die Kultivierungen 1 und 2**
 - Uridin 0,244 g L⁻¹
 - Xylose 10 g L⁻¹
 - Salzstammlösung (20fach) 50 mL L⁻¹
 - Spurenelementlösung (10.000fach) 0,1 mL L⁻¹
 - **Medium für die Kultivierungen 3, 4 und 5**
 - Uridin 0,244 g L⁻¹
 - Glucose 20 g L⁻¹
 - Salzstammlösung (20fach) 50 mL L⁻¹
 - Spurenelementlösung (10.000fach) 0,1 mL L⁻¹
 - **Medium für die Kultivierung 6**
 - Uridin 0,25 g L⁻¹
 - Xylose 20 g L⁻¹
 - Salzstammlösung (20fach) 50 mL L⁻¹
 - Spurenelementlösung (10.000fach) 0,1 mL L⁻¹
 -
 - **Natriumacetatpuffer 0,1 M**
 - Essigsäure (konz.) 5,72 mL L⁻¹
 - Na-Acetat 8,2 g L⁻¹
 - Na-Acetat-Lösung mit der Essigsäurelösung auf pH 4,8 eingestellt
 - **Natriumtetraboratlösung (Borax)**
 - Na₂B₄O₇·10H₂O 3,81 g L⁻¹
 - **4-Nitrophenol-α-D-Glucopyranosidlösung (PNPG)**
 - PNPG 0,01 g
 - Natrium-Acetatpuffer 10 mL

- **Salzstammlösung (20fach)**

-	(NH ₄) ₂ SO ₄	33 g L ⁻¹
-	KH ₂ PO ₄	50 g L ⁻¹
-	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g L ⁻¹
-	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 g L ⁻¹

- **Spurenelementlösung (10.000fach)**

-	Citronensäure·H ₂ O	50 g L ⁻¹
-	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	50 g L ⁻¹
-	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O	10 g L ⁻¹
-	CuSO ₄	1,6 g L ⁻¹
-	H ₃ BO ₃	0,5 g L ⁻¹
-	Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
-	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,37 g L ⁻¹

6.3 Formeln und Definitionen

Berechnung der Standardabweichung (Stabw.):

$$Stabw. = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2} \quad (6.1)$$

Berechnung des Mittelwertes (MW):

$$MW = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (6.2)$$

Berechnung des Regressionskoeffizienten (R²):

(6.3)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Definition der ΔX_{SDM} -Werte zur Bestimmung von Referenzgenen:

$$C = C_1 \cdot 2^{X_{\text{SDM}1,ij}}$$

$$C = C_2 \cdot 2^{X_{\text{SDM}2,ik}}$$

$$\log_2 \left(\frac{C_1}{C_2} \right) = \log_2 \left(\frac{2^{X_{\text{SDM}2,ik}}}{2^{X_{\text{SDM}1,ij}}} \right) = \log_2 2^{X_{\text{SDM}2,ik}} - \log_2 2^{X_{\text{SDM}1,ij}}$$

$$= X_{\text{SDM}2,ik} (\log_2 2) - X_{\text{SDM}1,ij} (\log_2 2) = X_{\text{SDM}2,ik} - X_{\text{SDM}1,ij}$$

6.4 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

bp	Basenpaar(e)
BTM	Biotrockenmasse
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus (engl. threshold cycle, Ct)

cDNA	komplementäre DNA
dATP	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidine 5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxytymidin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FAM	5-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GA	Glucoamylase
GRAS	Generally Regarded As Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kb	Kilobase(n)
KDa	Kilo Dalton
LUX	Light upon extension
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNPG	4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RNase	Ribonuklease
RP	Rückwärtsprimer
rRNA	ribosomale RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoproteins

tRNA,	transfer RNA
UV	Ultra-Violet
vergl.	Vergleich

Symbole

a_{ij}	Expressionslevel des Gens j der Probe i
A_{jk}	Verhältnis der Expressionsdaten zweier Gene
A_{400}	Photometrische Absorption bei 400 nm
a	Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz und Grundfluoreszenz
A_1	Grundfluoreszenz
A_2	maximale Fluoreszenz
b	Exponent
E	Effizienz
M_j	Genstabilitätsmaß für das Gen j
NFn	Normalisierungsfaktor unter Einbeziehung von n Genen
p	Exponent
St.dev.	Standard deviation (Standardabweichung)
s	Steigung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
V_{jk}	paarweise Variation zweier Gene
X_{SDM}	Maximum der zweiten Ableitung (engl. second derivative maximum, X_{SDM})
X_0	x-Wert des Maximums der ersten Ableitung

7 Literaturverzeichnis

1. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. , (2002), Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genom Biology*. 3(7): 0034.1 - 0034.11.
2. Gooday, G.W., (1995), Cell walls. " The Growing Fungus. Edited by N.N.R. Gow & G.M. Gadd. London: Chapman & Hall.
3. Schlegel, H.G., (1992), Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage ed., Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
4. Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Roberts, I.N. and Archer, D.B. , (1991), *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 9: 327–367
5. Alberts, B., Bray, D., Lewi, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., (1997), *Molekularbiologie der Zelle*.
6. Römpp, H., (1999), *Biotechnologie und Gentechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
7. Stryer, L., (1991), *Biochemie*.
8. Pazur, J.H., Ando, T., (1959), The action of an amyloglucoasidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*. 234: 1966-1970.
9. Bartoszewicz, K., (1986), Glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Acta Biochemica Polonica* 38: 17-29.

10. Emmler, M., (2007), Freisetzung von Glucoamylase in Kultivierungen mit *Aspergillus niger*. in Hempel D. C. (Ed.): . IBVT-Schriftenreihe, FIT-Verlag, Paderborn, zugl. Dissertation: TU Braunschweig.
11. Meagher, M.M. and Reilly P.J., (1989), Kinetics of the Hydrolysis of Di- and Trisaccharides with *Aspergillus niger* Glucoamylases I and II. Biotechnology Bioengineering. 34: 689-693.
12. Boel, E., Hjort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K.E., Fiil, N.P., (1984), Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. EMBO Journal. 3(5): 1097-1102.
13. Boel, E., Hansen, M.T., Hjort, I., Hoegh, I., Fiil, N.P., (1984), Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. EMBO Journal. 3(7): 1581-1585.
14. Svensson, B., Larsen K., and Gunnarsson A., (1986), Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. European Journal of Biochemistry. 154: 497-502.
15. Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W. & Berka, R.M. , (1990), Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. Bio-Technology. 8: 435-440.
16. Fowler, T., Berka, R.M., Ward, M. , (1990), Regulation of the glaA gene of *Aspergillus niger*. Current Genetic. 18: 537-545.
17. Hondmann, D.H.A., Visser, J. , (1994), Carbon metabolism. In *Aspergillus*: 50 years on; eds Martinelli, S.D. and Kinghorn, J.R.. Elsevier, Amsterdam: 61-139.
18. Davies, R.W., (1994), Heterologous gene expression and protein secretion in *Aspergillus* In *Aspergillus*: 50 years on. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokio: Elsevier: 527-560.
19. Verdoes, J.C., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., (1995), Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. Applied Microbiology Biotechnology. 43: 195-205.

20. Barton, L.L., Georgi C.E., Lineback, D.R., (1969), The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by *Aspergilli*. Journal of Applied Microbiology. 15: 344.
21. Bodie, E.A., Bower, B., Berka, R.M., Dunn-Coleman, N.S., (1994), Economically important organic acid and enzyme products. . In *Aspergillus: 50 years on*; eds S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn. Elsevier, Amsterdam: 561-602.
22. Nevalainen H, T.o.V., (2004), Application of genetic engineering for strain improvement in filamentous fungi. Handbook of Fungal Biotechnology, von Rai Bharat, K G Mukerji, Paul D Bridge, Deepak Bhatnagar, Arora K Arora, Verlag: Marcel Dekker: 193-206.
23. Ruijter, G.J.G., Visser, J., (1997), Carbon repression in *Aspergilli*. Microbiology Letters. 151(2): 103-114.
24. Dowzer, C.E., Kelly, J.M. , (1991), Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology. 11(11): 5701-5709.
25. Finkelstein, D.B., (1987), Improvement of enzyme production in *Aspergillus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 53: 349-352.
26. Berka, R.M., Kodama, K.H., Rey, M.W., Wilson, L.J. Ward M., (1991), The development of *Aspergillus niger* var. *awamori* as hist for the expression and secretion of heterologous gene proucts. . Biochemical Society Transactions. 19: 17-23.
27. van Brunt, J., (1986), Fungi: The perfect hosts (query). Biotechnology. 4: 1057-1062.
28. Friehs, K., Reardon, K.F., (1993), Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations. Advances Biochemistry Engeneering Biotechnology. 48: 53-77.
29. Sharkey, F.H., Banat, I. M., Marchant, R., (2002), Detection and quantification of gene expression in enviromental biotechnology. Applied and Enviromental Microbbiology. 70(7): 3795-3806.

30. Ginzinger, D.G., (2002), Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. International Society for Experimental Hematology, published by Elsevier Science. 30: 503-512.
31. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki R., Horn, G., Erlich, H., (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. 51: 263-273.
32. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., (2005), Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity. 6: 279–284.
33. Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., (1997), Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Bio Techniques. 22(1): 103-101, 134-108.
34. Mülhardt, C., (1999), Der Experimentator: Molekularbiologie. Vol. 1. Auflage. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag.
35. Wong, M.L., Medrano, J. F., (2005), Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 39(1): 75-85.
36. Bustin, S.A., (2002), Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology. 29: 23-39.
37. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., (2004), Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters. 26(6): 509-515.
38. Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W., (2003), Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. Nucleic Acids Research. 31(20): 1-6.

39. Hocquette, J.-F., Brandstetterb, A.M. , (2002), Common practice in molecular biology may introduce statistical bias and misleading biological interpretation. . The Journal of Nutritional Biochemistry. 13(6): 370-377.
40. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., (1996), Real time quantitative PCR. Genome Research. 6: 986-994.
41. Loeffler, J., Hebart, H., Cox, P., Flues, N., Schumacher, U., Einsele, H., (2001), Nucleic Acid Sequence-Based Amplification of *Aspergillus* RNA in Blood Samples. Journal of Clinical Microbiology. 39(4): 1626-1629.
42. Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., (2004), Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. BioTechniques. 37(1): 112-119.
43. Liss, B., (2002), Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. Nucleic Acids Research. 30: e89.
44. Bustin, S.A., (2000), Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 25: 169-193.
45. Bhatia, P., Taylor, W.R., Greenberg, A.H., Wright, J.A., (1994), Comparison of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. Analytical Biochemistry. 216: 223-226.
46. H. Zong, J.W.S., (1999), Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. Research Communicatios. 259: 523-526.
47. Bustin S A, N.T., (2004), Pitfalls of quantitative real-time reverse-transkription polymerase chain reaktion. Journal of Biomolecular Techniques. 15(3): 155-166.
48. Freeman, W.M., Walker, S., Vrana, K.E., (1999), Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. BioTechniques 26: 112-125.

49. Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M, Georgiev, I.P, Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W., (2001), Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding protein 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*. 22: 91-102.
50. Talaat, A.M., Howard, S.T., Hale, W. Lyons, R., Garner, H., Johnston, S.A., (2002), Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. . *Nucleic Acids Research* 30(20): e104.
51. Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., Williams, P.M. , (1999), Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vivo. *Analytical Biochemistry*. 270: 41-49.
52. Wall, S.J. and Edwards D.R., (2002), Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Analytical Biochemistry*. 300: 269-273.
53. Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaiei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R., (2001), Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular and cellular Probes*. 15(5): 307-311.
54. Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., Walters, E.H., (2002), β -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. . *Thorax* 57: 765-770.
55. Kea, L.D., Chen, Z., Yunga, W.K.A., (2000), A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Molecular and Cellular Biology*. 14: 127-135.
56. Suzuki, Y., Higgins, P.J., Crawford, D.R., (2000), Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 29: 332-337.

57. Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., (2004), Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 64: 5245–5250.
58. Kelly, S., Grimm, L., Hengstler, J., Schultheis, E., Krull, R., Hempel, D.C., (2004), Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioproc. Biosys. Eng.* 26(5): 315-323.
59. Grimm, L.H., Emmeler, M., Horn, H., Krull, R., Hempel, D.C., (2004), Morphologie und Produktbildung des Pellet bildenden Pilzes *Aspergillus niger*. *Chem. Ing. Tech.* 76(9): 1232.
60. Fidel, S., Doonan, J.H., Morris, N.R., (1988), *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a g-actin. *Genetics*. 70: 283-293.
61. Manchester, K., (1995), Value of A260/A280 Ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*. 19(2): 208-210.
62. Warburg, O., Christian W., (1942), Isolation and Cristallisation of Enolase. *Biochemie*. 310: 384-421.
63. Schrimpf, G., (2002), *Gentechnische Methoden Spektrum*, Akademischer Verlag
64. Nandakumar, M.P., Marten, M. R., (2002), Comparison of lysis methods and preparation protocols for one-and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular. proteine. *Electrophoresis*. 23: 2216-2222.
65. Jungebloud, A., Bohle, K., Göcke, Y., Cordes, C., Horn, H., Hempel, D. C., (2007), Quantification of product-specific gene expression in biopellets of *Aspergillus niger* with real-time PCR. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 653-660.
66. Stahlberg, A., (2004), Properties of the Reverse Transkription Reaction in mRNA Quantification. *Clinical Chemistry*. 50: 509-515.

67. Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E., Cumps, J., (2005), Improved real-time PCR RT PCR method for high-throuput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* 38: 287-293.
68. Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A.J., (2000), Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Biochemical Biophysical Methods*. 46: 69-81.
69. Lindbjerg Andersen C., L.J., J., Ørntoft, T.F., (2004), Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 64: 5245–5250.
70. Schmittgen, T.D., (2001), Real-Time Quantification. *Methods*. Vol. 25. 383-385.
71. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. , (1999), Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Biotechnology*. 75: 291–295.
72. Edwards, D.R., Denhardt, D.T., (1985), A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after simulation of quiescent mouse fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 157: 127-143.
73. Ganzlin, M., (2000), Untersuchungen der induzierten Proteinproduktion unter Kontrolle des Glucoamylasepromotors in *Aspergillus niger*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina: Braunschweig.
74. Hille, A., (2007), Stoffumsatz und -transport in Biopellets von *Aspergillus niger*. in Hempel D. C. (Ed.): IBVT-Schriftenreihe, FIT-Verlag, Paderborn, zugl. Dissertation: TU Braunschweig.
75. MacKenzie, D.A., (2000), Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology Techniques*. 26: 193-200.

76. Mattern, I.E., Van Noort, J.M., Van den Berg, P., Archer, D.B., Roberts, I.N., Van den Hondel, C.A.M.J.J., (1992), Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. Molecular Genetics and Genomics. 234: 332-336.